

Interaktion von Rezeptortyrosinkinasen und Pertussistoxin-sensitiven G-Proteinen am Beispiel des Rezeptors für Platelet-derived Growth Factor (PDGF)

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs

Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur

an der

Universität GH Essen

vorgelegt von

Christiane Habich

aus Recklinghausen

August 2001

Tag der mündlichen Prüfung: 29. 05. 2002

1. Gutachter:	Herr Prof. Dr. W. Siffert
2. Gutachter:	Herr Prof. Dr. H. Esche
3. Gutachter:	Herr Prof. Dr. K.-H. Jakobs

Abstract

Thema dieser Dissertation war die Untersuchung, ob Pertussistoxin (PTX)-sensitive G-Proteine an der Signaltransduktion des Rezeptors für Platelet-derived Growth Factor (PDGF) beteiligt sind. Unsere Befunde zeigen erstmalig, daß PTX die durch PDGF induzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisierung an humanen Hautfibroblasten hemmt. Mechanistisch spielt dabei die direkte Interaktion von G-Proteinen mit dem PDGF-Rezeptor und der Phospholipase C (PLC) γ eine Rolle. Wir konnten zeigen, daß nach PDGF-Stimulation die Menge an $\text{G}\alpha_i$ -Protein zunimmt, die sich mit dem PDGF-Rezeptor bzw. der PLC γ kopräzipitieren läßt. An NIH3T3-Zellen konnte im Gegensatz zu den humanen Hautfibroblasten zwar eine Zunahme der $\text{G}\alpha_i$ -Protein-Assoziation mit dem PDGF-Rezeptor beobachtet werden, eine Vorbehandlung mit PTX bewirkte jedoch keine Hemmung der durch PDGF stimulierten Ca^{2+} -Signale. Diese Daten stehen im Einklang mit anderen Untersuchungen. Hier wurde die Beobachtung gemacht, daß an primären Zellen eine Reihe früher Signale PTX-sensitiv sind, während dies an transformierten Zellen nicht mehr der Fall ist. Die Ursache hierfür wird u.a. in einer Hochregulation der Rezeptorzahl vermutet. Man muß daher davon ausgehen, daß PTX-sensitive G-Proteine Signale, die durch Stimulation von RTK entstehen, unterstützen können. Weiterhin haben wir an den primären Hautfibroblasten untersucht, wie sich eine Behandlung mit PTX auf späte durch PDGF stimulierte Zellantworten auswirkt. Unsere Ergebnisse zeigen, daß die funktionelle Ausschaltung von G_i -Proteinen zu einer Hemmung der durch PDGF stimulierten DNA-Synthese und der Zellmotilität führt. Frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe hatten gezeigt, daß bei einer Gruppe von Patienten mit essentieller Hypertonie Ca^{2+} -Signale und DNA-Synthese nach Stimulation von Rezeptoren, die an PTX-sensitive G-Proteine koppeln, im Vergleich zu Kontrollpersonen gesteigert sind. Auch die durch PDGF stimulierten Ca^{2+} -Signale und die DNA-Synthese an Zellen hypertensiver Patienten waren gesteigert. Eine PTX-Vorbehandlung der Zellen führte zu einer Hemmung dieser Signale. Es konnte gezeigt werden, daß diese gesteigerten Signale mit einem Polymorphismus im Gen der G-Protein-Untereinheit $\text{G}\beta_3$ (*GNB3* C825T) und dem Auftreten einer Spleißvariante, die als $\text{G}\beta_3\text{s}$ bezeichnet wurde, assoziiert sind. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob $\text{G}\beta_3\text{s}$ biologisch aktiv ist und mit dem PDGF-Rezeptor assoziieren kann. Nachdem die biologische Funktionalität von $\text{G}\beta_3\text{s}$ nachgewiesen werden konnte, wurde die Beteiligung von $\text{G}\beta_3$ bzw. $\text{G}\beta_3\text{s}$ an der Signaltransduktion von PDGF untersucht. Eine direkte Interaktion von aktiviertem PDGF-Rezeptor und $\text{G}\beta$ -Proteinen - $\text{G}\beta_1$ und $\text{G}\beta_3$ - konnte gezeigt werden. Der hier beschriebenen Interaktion von G-Proteinen mit dem PDGF-Rezeptor könnte unter dem Gesichtspunkt der genetisch fixierten Unterschiede in der Signalübertragungsstärke nach Stimulation PTX-sensitiver G-Proteine und der Funktion von PDGF in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen, eine wichtige pathophysiologische Relevanz zukommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1. PDGF	1
1.1.1. Entdeckung, Vorkommen, Isoformen	1
1.1.2. Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von PDGF	2
1.2. Zelluläre Rezeptoren	3
1.2.1. Struktur und Isoformen des PDGF-Rezeptors	4
1.2.2. Signaltransduktion des PDGF-Rezeptors	5
1.2.2.1. Dimerisierung und Autophosphorylierung des PDGF-Rezeptors	5
1.2.2.2. Interaktionen von PDGF-Rezeptor und intrazellulären Signalproteinen	6
1.2.3. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und heterotrimere G-Proteine: Struktur und Funktion	9
1.2.4. PTX-sensitive G-Proteine	11
1.3. Die MAP-Kinasen	12
1.3.1. Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade über RTK	13
1.3.2. Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade über GPCR	13
1.3.2.1. Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade durch Stimulation von GPCR, die an PTX-insensitive G-Proteine koppeln	13
1.3.2.2. Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade durch Stimulation von GPCR, die an PTX-sensitive G-Proteine koppeln	15
1.4. Beteiligung von heterotrimeren G-Proteinen an der frühen Signaltransduktion von RTK	17
1.5. Zielsetzung der Arbeit	19
2. Material und Methoden	22
2.1. Material	22
2.1.1. Chemikalien	22
2.1.1.1. Chemikalien, Feinchemikalien und Lösungsmittel	22
2.1.1.2. Inhibitoren, Agonisten und Antikörper	23
2.1.1.3. Radiochemikalien	24
2.1.2. Materialien für molekularbiologische Arbeiten	24
2.1.2.1. Enzyme und Reaktionspuffer	24
2.1.2.2. Primer und Nucleosid-Triphosphate	25
2.1.2.3. Verwendete Expressionsvektoren	26
2.1.3. Verbrauchsmaterialien	26
2.1.4. Geräte	27
2.1.5. Puffer, Lösungen und Medien	27
2.1.5.1. Häufig verwendete Lösungen	27
2.1.5.2. Protease- und Tyrosinphosphatase-Inhibitoren	27

2.1.5.3.	Lösungen für die Molekularbiologie	28
2.1.5.4.	Medien und Seren für die Zellkultur	28
2.1.5.5.	Lösungen für die Präparation von Zellysaten	29
2.1.5.6.	Lösungen für die Präparation von Zellmembranen	29
2.1.5.7.	Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese und den Elektrotransfer	29
2.1.5.8.	Lösungen für den immunologischen Nachweis von Proteinen im Westernblot	31
2.1.5.9.	Lösungen für die Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration	31
2.1.5.10.	Lösungen für die PTX katalysierte <i>in vitro</i> ADP-Ribosylierung	32
2.1.5.11.	Lösungen für die Messung der MAP-Kinase-Aktivität	32
2.2.	Methoden	33
2.2.1.	Allgemeine molekularbiologische Methoden	33
2.2.1.1.	Reinigung von DNA	33
2.2.1.2.	Präparation von Plasmid-DNA	33
2.2.1.3.	Quantifizierung von DNA im Spektralphotometer	33
2.2.1.4.	Restriktion von Plasmid-DNA	34
2.2.1.5.	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	34
2.2.2.	Epitop-Markierungen	35
2.2.2.1.	PCR-Mutagenese	35
2.2.2.2.	Vorbehandlung des Zielvektors pcDNA3.1	37
2.2.2.3.	Ligation	37
2.2.2.4.	Bakterien-Transformation	38
2.2.2.5.	Klon-PCR	39
2.2.3.	Zellkultur	40
2.2.4.	Transiente Transfektion	41
2.2.4.1.	Bestimmung der Transfektionseffizienz	42
2.2.4.2.	Transfektion mit DAC-30™	43
2.2.4.3.	Transfektion mit Roti®-Fect	44
2.2.5.	Proteinbiochemische Methoden	45
2.2.5.1.	Präparation von Zellysaten	45
2.2.5.2.	Membranpräparation	46
2.2.5.3.	Proteinbestimmung nach Pierce	47
2.2.5.4.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	48
2.2.5.5.	Elektrotransfer	49
2.2.5.6.	Immunologischer Nachweis von Proteinen im Westernblot	50
2.2.6.	Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration	51
2.2.7.	Chemotaxis	53
2.2.8.	Messung der DNA-Synthese	54
2.2.9.	PTX-katalysierte <i>in vitro</i> ADP-Ribosylierung	54
2.2.9.1.	Präparation der Zellysate in RIPA-Puffer	55
2.2.9.2.	Immunpräzipitation	55
2.2.9.3.	PTX-Aktivierung	55
2.2.9.4.	PTX katalysierte <i>in vitro</i> ADP-Ribosylierung	56
2.2.10.	Messung der MAP-Kinase-Aktivität	56
2.2.10.1.	Präparation der Zellysate	57
2.2.10.2.	Immunpräzipitation	57
2.2.10.3.	<i>In vitro</i> Immunkomplex-Kinase-Assay	57
2.2.11.	Nachweis einer direkten Interaktion von PDGF-Rezeptor und HA-markierten Gβ-Proteinen	58

2.2.12.	Statistik und graphische Darstellung	58
3.	Ergebnisse	59
3.1.	Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration	59
3.2.	Nachweis einer direkten Interaktion von PTX-sensitiven G-Proteinen, PDGF-Rezeptor und PLC γ	62
3.2.1.	Immunpräzipitation des PDGF-Rezeptors	63
3.2.2.	Nachweis einer Assoziation von PDGF-Rezeptor und G $_i$ -Proteinen mittels PTX- katalysierter <i>in vitro</i> ADP-Ribosylierung	64
3.2.3.	Zeitverlauf der Assoziation von PDGF-Rezeptor und PTX-sensitiven G-Proteinen an humanen Hautfibroblasten	68
3.2.4.	Nachweis einer Assoziation von PLC γ und G $_i$ -Proteinen mittels PTX-katalysierter <i>in vitro</i> ADP-Ribosylierung	70
3.3.	Effekt einer PTX-Behandlung auf die durch PDGF stimulierte Chemotaxis	71
3.4.	Effekt einer PTX-Behandlung auf die durch PDGF stimulierte DNA-Synthese	72
3.5.	Die Bedeutung der G β 3-Variante G β 3s am Beispiel der Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade	73
3.5.1.	Etablierung des <i>in vitro</i> Immunkomplex-Kinase-Assays	75
3.5.2.	Einfluß von G β 3 und G β 3s auf die MAP-Kinase-Aktivität	77
3.6.	Nachweis einer Interaktion von PDGF-Rezeptor und HA-markierten G β -Proteinen	81
3.6.1.	HA-Epitop-Markierung von G β -Proteinen	81
3.6.2.	Nachweis von HA-markierten G β -Proteinen im Westernblot	82
3.6.3.	Nachweis einer Koimmunpräzipitation von HA-markierten G β -Proteinen und dem PDGF-Rezeptor	83
4.	Diskussion	85
4.1.	Interaktion von PDGF-Rezeptor, PTX-sensitiven G-Proteinen und der PLC γ	87
4.2.	G β 3 und die Spleißvariante G β 3s: Rolle in der Signaltransduktion von PDGF?	98
5.	Zusammenfassung	104
6.	Literaturverzeichnis	106

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
ADP	Adenosin 5'-diphosphat
Ak	Antikörper
ATP	Adenosin 5'-triphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
Ci	Curie
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Ethylen Glykol bis (-aminoethylether) N, N',N',N'-Tetraacetat
G-Protein	GTP-bindendes Protein
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl) piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
IGF	Insulin-like Growth Factor
kDa	kilo Dalton
LPA	Lysophosphatidsäure („Lysophosphatidic Acid“)
MAP-Kinase	Mitogen Activated Protein-Kinase
MBP	Myelin Basic Protein
NAD	Nicotinamid Adenin Dinukleotid
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PTX	Pertussistoxin
rpm	Umdrehungen pro Minute („revolutions per minute“)
RT	Raumtemperatur
S.D.	Standardabweichung („Standard Devition“)
S.E.M.	Standardfehler („Standard Error of the Mean“)
SPP	Sphingosin-1-Phosphat („Sphingosine-1-phosphate“)

1. Einleitung

Rezeptortyrosinkinasen (RTK) sind eine wichtige Gruppe von Rezeptoren, zu denen u.a. die Rezeptoren für Insulin, Insulin-like Growth Factor (IGF), Epidermal Growth Factor (EGF) und Platelet-derived Growth Factor (PDGF) gehören. Eine weitere große Gruppe bilden die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren („G protein-coupled receptor“, GPCR), die durch Interaktion mit G-Proteinen ihre Signale in die Zelle transduzieren. Zu dieser Rezeptorfamilie gehören u.a. die Adrenozeptoren, die muskarinergen Acetylcholinrezeptoren und die Serotoninrezeptoren. Sowohl RTK als auch GPCR üben wichtige Funktionen bei der Regulation zahlreicher physiologischer und pathophysiologischer Prozesse aus. Dem Verständnis der damit verbundenen Signaltransduktionsmechanismen kommt daher eine große Bedeutung zu.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Interaktion von heterotrimeren G-Proteinen mit dem PDGF-Rezeptor. Im folgenden sollen daher diese beiden Rezeptor-Systeme eingehender dargestellt werden.

1.1. PDGF

1.1.1. Entdeckung, Vorkommen, Isoformen

Bereits 1973 postulierte Balk et al. Thrombozyten als eine Quelle für mitogene Faktoren. Seine Arbeitsgruppe beobachtete Wachstum von Hühnerfibroblasten in Medium, dem Serum zugesetzt wurde. Kulturen hingegen, in deren Medium nur Plasma enthalten war, stellten das Wachstum ein. PDGF wurde dann erstmalig 1979 von Heldin et al. aus den α -Granula von Thrombozyten isoliert und aufgereinigt.

PDGF ist ein Wachstumsfaktor für Fibroblasten und glatte Gefäßmuskelzellen. Aber auch weitere Zelltypen wie Endothelzellen, aktivierte Makrophagen / Monozyten und Zytotrophoblasten können durch PDGF stimuliert werden (Raines et al., 1990).

PDGF gehört zu der Gruppe der Peptidwachstumsfaktoren. Es ist ein Proteindimer bestehend aus homologen A (17 kDa)- und B (14 kDa)-Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und die drei Isoformen bilden können: PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB. Die verschiedenen Isoformen binden mit unterschiedlicher Spezifität an die beiden strukturell verwandten Rezeptortyrosinkinasen, PDGF α - bzw. β -Rezeptor. 70 % des gereinigten PDGF aus humanen Thrombozyten besteht aus dem Heterodimer PDGF-AB,

während 5 - 25 % aus PDGF-BB bestehen, den restlichen Anteil macht PDGF-AA aus (Raines et al., 1990). Erst kürzlich wurden PDGF-C (Li et al., 2000) und PDGF-D (Bergsten et al., 2001; LaRoche et al., 2001) identifiziert, die beide als Homodimere vorkommen. PDGF-CC wurde als Ligand für den PDGF α -Rezeptor charakterisiert, während PDGF-DD an den PDGF β -Rezeptor bindet.

1.1.2. Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von PDGF

PDGF hat neben seiner Bedeutung bei der Wundheilung (Robson et al., 1992) eine Vielzahl von physiologischen, aber auch pathophysiologischen Funktionen. Wie bereits ausgeführt, ist PDGF ein wichtiger Wachstumsfaktor für fibroblastäre und hämatopoetische Gewebe und spielt daher bei Wachstums- und Differenzierungsprozessen sowie bei der Geweberegeneration eine wichtige Rolle.

So ist PDGF von großer Bedeutung bei der Embryonalentwicklung. Studien an Knock-out Mäusen haben gezeigt, daß es bei Ausfall der B-Kette (Levéen et al., 1994) oder des β -Rezeptors (Soriano, 1994) zu einer gestörten Nierenentwicklung kommt. Ebenso kommt es zu Störungen bei der Entwicklung der Blutgefäße. Ein Ausfall der A-Kette führt zu einer Fehlentwicklung der Lungen-Alveolen (Boström et al., 1996). Der Ausfall des α -Rezeptors (Soriano, 1997) führt ebenfalls zu schweren Störungen, so z.B. zu einem Phänotyp mit kranialen Deformationen.

Weiterhin stimuliert PDGF die Chemotaxis verschiedener Zelltypen, darunter Makrophagen, Fibroblasten und glatte Gefäßmuskelzellen. Neben dieser chemotaktischen Wirkung kann PDGF auch die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen anregen und beeinflusst den Tonus von Blutgefäßen. Daher wird vermutet, daß PDGF an der Regulation des Blutflusses, z.B. in Randgebieten von Wunden, beteiligt ist (Rodt et al., 1996; Berk et al., 1986). Durch seine proliferativen Wirkungen auf Gefäßmuskelzellen und die Stimulation der Chemotaxis von Makrophagen ist PDGF - das z.B. durch aktivierte Blutplättchen oder bei der Thrombenbildung entsteht - an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt (Ross, 1986).

Auch bei entzündlichen und fibrosierenden Erkrankungen kommt PDGF eine wichtige Funktion zu. Bei der rheumatoiden Arthritis (Raines et al., 1990) oder der Osteoarthritis (Hamerman et al., 1987) wurde PDGF in z.T. hohen Konzentrationen u.a. in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen.

Von besonderer Wichtigkeit ist die Tatsache, daß das sis-Protoonkogen des Simian Sarcoma Virus mit der B-Kette von PDGF identisch ist (Waterfield et al., 1983) und an der Transformation sensibler Zelltypen beteiligt ist. Beim Menschen findet man eine Überexpression von PDGF und PDGF-Rezeptor in Glioblastomen und bestimmten Sarkomen (Heldin et al., 1996). Man vermutet daher, daß PDGF die Proliferation dieser Tumore zusammen mit anderen Wachstumsfaktoren stimulieren kann.

Zusätzlich wirkt PDGF antiapoptotisch. Es konnte u.a. für neuronale PC12-Zellen gezeigt werden, daß für den antiapoptotischen Effekt von PDGF die Aktivierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-Kinase) von besonderer Bedeutung ist (Yao und Cooper, 1995).

Im folgenden werden die Rezeptoren und Signalmechanismen beschrieben, die auf zellulärer Ebene erforderlich sind, um ein durch PDGF stimuliertes Signal in die Zelle weiterzuleiten und die anschließenden Zellantworten auszulösen.

1.2. Zelluläre Rezeptoren

Wachstumsfaktoren wie PDGF, EGF, IGF oder Insulin sind Peptidhormone und bedürfen für ihre Signalübertragung eines membranständigen Rezeptors. Die genannten Rezeptoren werden durch Liganden-induzierte Dimerisation aktiviert. RTK bestehen aus einer extrazellulären, den Liganden bindenden Domäne, einer transmembranären Domäne sowie der intrazellulären Kinase-Domäne. Die RTK lassen sich aufgrund ihrer Struktur, insbesondere der Struktur der extrazellulären Domänen, aber auch aufgrund des Vorkommens eines intrazellulären Kinase-Inserts (siehe Tabelle 1.1.) in verschiedene Typen einteilen (Heldin, 1995).

Tabelle 1.1.: Rezeptortyrosinkinasen-Familien (Beispiele):

Familie	Mitglied	Charakteristika
PDGF-Rezeptor Familie	PDGF α -und β -Rezeptor CSF ¹ -Rezeptor	Fünf Immunglobulin-ähnliche ED ² , Kinase-Insert
EGF-Rezeptor Familie	EGF-Rezeptor	Zwei Cystein-reiche ED
IGF-Rezeptor Familie	Insulinrezeptor IGF-I-Rezeptor	Heterotetramer aus α -und β -Ketten
FGF-Rezeptor Familie	FGF ³ -Rezeptor-1, 2, 3, 4	Zwei bis drei Immunglobulin-ähnliche ED

¹CSF: Colony Stimulating Factor, ²ED: extrazelluläre Domäne, ³FGF: Fibroblast Growth Factor

1.2.1. Struktur und Isoformen des PDGF-Rezeptors

Wie bereits ausgeführt, gibt es zwei Isoformen von PDGF-Rezeptoren, den PDGF α - und den PDGF β -Rezeptor, die sich in ihrem Expressionsmuster und in ihrer Affinität zu den drei PDGF-Isoformen unterscheiden. So bindet der PDGF α -Rezeptor alle drei PDGF-Isoformen mit hoher Affinität. Dagegen interagiert der PDGF β -Rezeptor nur mit dem PDGF-BB-Homodimer mit hoher Affinität, mit geringerer Affinität mit PDGF-AB und praktisch nicht mit PDGF-AA. Da es sich bei PDGF um ein Proteindimer handelt, besitzt es zwei Rezeptorbindungsstellen. So können die unterschiedlichen PDGF-Isoformen unterschiedliche PDGF-Rezeptordimere induzieren. In Abbildung 1.1. ist die Struktur des PDGF β -Rezeptors als Monomer dargestellt.

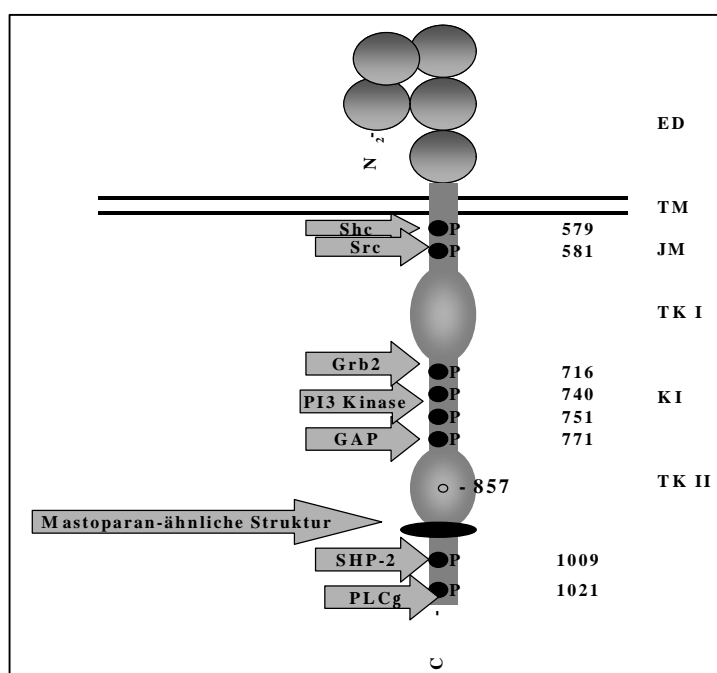


Abb. 1.1.: Schematische Struktur des PDGF β -Rezeptors (Monomer)

Struktur des PDGF β -Rezeptors (Monomer) mit den fünf Immunglobulin-ähnlichen, extrazellulären Domänen (ED), der transmembranären Region (TM), der juxtamembranären Domäne (JM) und den beiden Tyrosinkinase-Domänen (TK1 und TK2), die durch das Kinase-Insert (KI) unterbrochen werden. Die Ziffern bezeichnen wichtige Tyrosinphosphorylierungsstellen für intrazelluläre Signalproteine. Außerdem ist die Position der Mastoparan-ähnlichen Struktur angegeben.

Der extrazelluläre Anteil des Rezeptors besteht aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen. Die äußersten drei dieser Domänen sind für die Ligandenbindung verantwortlich. Auf die transmembranäre Region folgt ein 49 Aminosäuren großer Bereich, die juxtamembranäre Domäne. Dort liegen wichtige Bindungsstellen u.a. für die Src-Kinase oder Adapterproteine. Es folgt die Tyrosinkinase-Domäne, die durch eine 100 Aminosäuren große Sequenz, das Kinase-Insert, unterbrochen wird. Auch hier liegen wichtige Phosphorylierungsstellen für intrazelluläre Signalproteine, die im weiteren ausführlicher beschrieben werden (siehe 1.2.2.2.). In der C-terminalen Region des Rezeptors befindet sich ein konserviertes Aminosäuremotiv, das eine α -helikale Struktur ausbilden kann, die dem Peptid Mastoparan entspricht. Dieses

Motiv kommt auch in anderen Rezeptoren, u.a. dem EGF- und FGF-Rezeptor vor (Feinstein und Larhammar, 1990). Die Bedeutung dieses Sequenzmotivs wird zu einem späteren Zeitpunkt erläutert werden (siehe 4.1.).

1.2.2. Signaltransduktion des PDGF-Rezeptors

Im folgenden soll die Signaltransduktion von PDGF, ausgehend von der Aktivierung des Rezeptors bis zu den intrazellulär gelegenen Effektorsystemen, beschrieben werden.

1.2.2.1. Dimerisierung und Autophosphorylierung des PDGF-Rezeptors

Die Bindung von PDGF führt zur nicht-kovalenten Dimerisierung zweier Rezeptor-Moleküle. Dies begünstigt eine gegenseitige Auto-(trans)-phosphorylierung der beiden Rezeptormonomere. Diese Modifikation bewirkt eine Konformationsänderung und damit eine Zunahme der Tyrosinkinase-Aktivität (Keating und Williams, 1988). Zahlreiche Tyrosinreste im PDGF-Rezeptor-Molekül - innerhalb und außerhalb der Kinase-Domäne - werden schließlich phosphoryliert. Man vermutet, daß die Aktivitätszunahme der Tyrosinkinase-Funktion durch Phosphorylierung eines regulatorischen Tyrosinrestes bewirkt wird. Die Analyse von Rezeptor-Mutanten weist auf den Tyrosin-Rest an Position 857 hin (Kazlauskas und Cooper, 1989). Die phosphorylierten Tyrosinreste außerhalb der Kinase-Domäne dienen als Bindungsstellen für intrazelluläre Signalproteine.

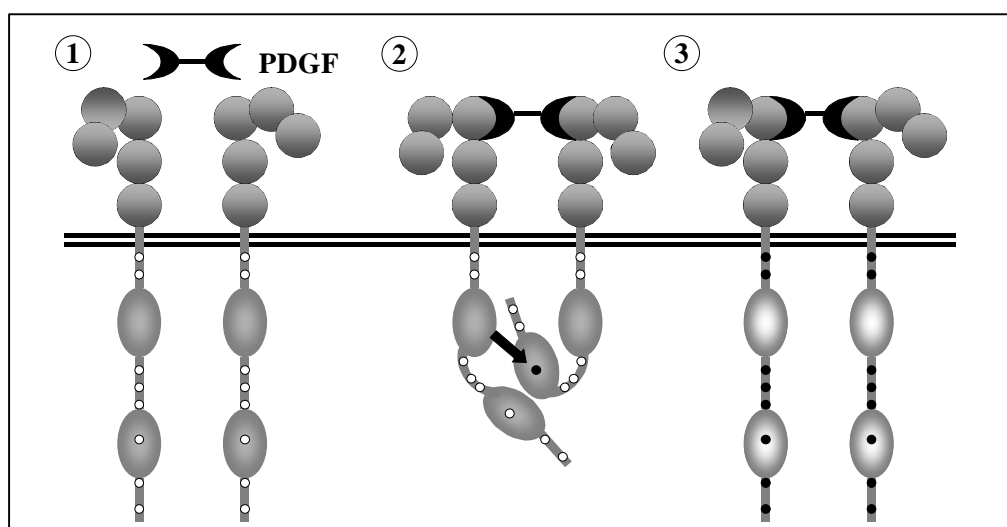


Abb. 1.2.: Dimerisierung und Auto-(trans)-phosphorylierung des PDGF-Rezeptors

(1) Der PDGF-Rezeptor besteht im inaktiven Zustand aus zwei Monomeren. (2) Nach Bindung von PDGF an den Rezeptor kommt es zur Rezeptordimerisierung und zur gegenseitigen Auto-(trans)-phosphorylierung. (3) Der aktivierte Rezeptor kann nun Proteine der Signalkaskade binden und aktivieren.

1.2.2.2. Interaktionen von PDGF-Rezeptor und intrazellulären Signalproteinen

Wie gerade ausgeführt, kommt es nach Aktivierung des PDGF-Rezeptors zur wechselseitigen Phosphorylierung an zahlreichen Tyrosinresten. Diese Tyrosinreste dienen als Interaktionsstellen für weitere Proteine, die für die Signalweiterleitung in das Zellinnere verantwortlich sind. Solche Interaktionen werden über spezifische Domänen der beteiligten Proteine hergestellt (Pawson und Scott, 1997). So gibt es Signalproteine, die Src homology 2 (SH2)- oder Phosphotyrosin-bindende (PTB)-Domänen besitzen, welche Phosphotyrosinreste in einem definierten Aminosäuremotiv erkennen können. Daneben gibt es Proteine mit SH3-Domänen, die an prolinreiche Regionen binden. Signalproteine, die Pleckstrin-homologe (PH)-Domänen besitzen, können wiederum an Phospholipide der Zellmembran binden (Harlan et al., 1994) oder eine Interaktion mit $G\beta\gamma$ -Untereinheiten eingehen (Tsukada et al., 1994).

Zur Weiterleitung des PDGF-Signals ist die Bindung von verschiedenen Signalproteinen an die aktivierte RTK nötig. Es konnten mehr als 10 verschiedene Proteine mit SH2-Domänen identifiziert werden, die an unterschiedliche Phosphotyrosinreste der PDGF-Rezeptoren binden (Heldin et al., 1998). Dazu gehören u.a. Phospholipase $C\gamma$ (PLC γ), PI3-Kinase, Adaptermoleküle wie Growth Factor Receptor-binding Protein (Grb 2), Shc und die Src-Kinase-Familie (siehe Abb. 1.1). Für die Bindungsspezifität sind die 3 - 6 Aminosäuren verantwortlich, die C-terminal vom Phosphotyrosinrest gelegen sind. Im folgenden sollen diese Signalproteine und ihre Beteiligung an den Signalwegen erläutert werden (siehe Abb. 1.3.).

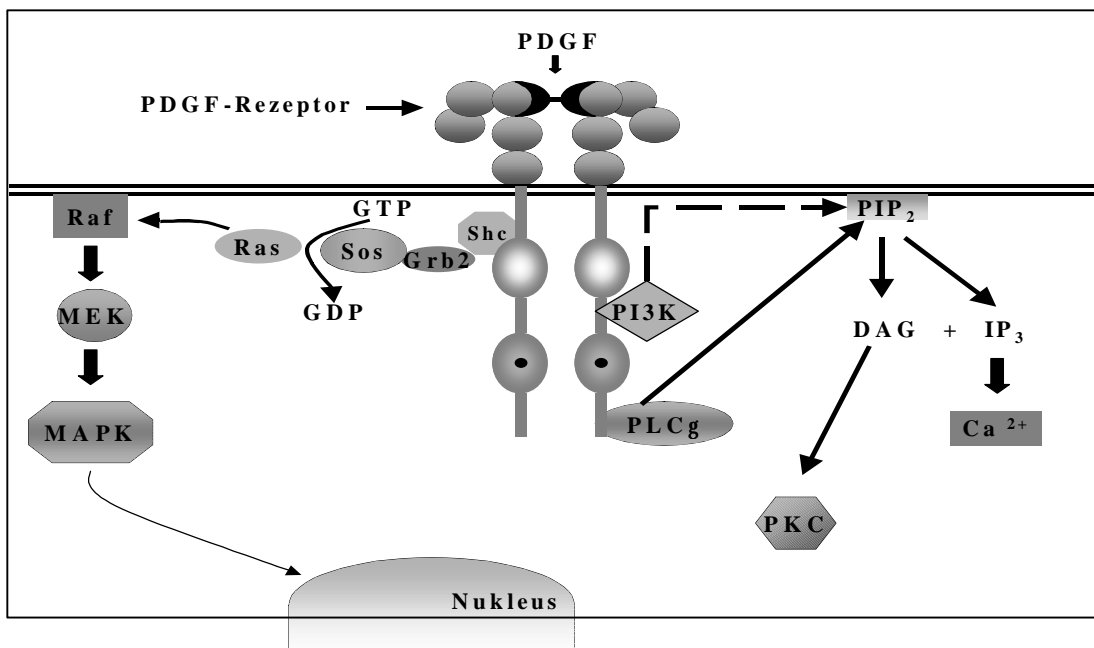


Abb. 1.3.: Signalproteine und Signalwege (Erläuterung der Abbildung erfolgt im nachfolgenden Text)

Die PI3-Kinasen gehören zu einer Familie von Enzymen, die Phosphatidylinositol in der 3'-Position phosphorylieren können. PI3-Kinasen bestehen aus einer katalytischen Untereinheit, die nach ihrem Molekulargewicht als p110 bezeichnet wird und einer regulatorischen Untereinheit, p85. Die Untereinheit p85 bindet über ihre beiden SH2-Domänen an die phosphorylierten Tyrosinreste 740 und 751 im Kinase-Insert des PDGF β -Rezeptors (Fantl et al., 1992). Dadurch kommt es zur Aktivierung der p110-Untereinheit, der genaue molekulare Aktivierungsmechanismus ist dabei noch unklar. Bevorzugtes Substrat der PI3-Kinasen sind Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. PI3-Kinasen sind ebenso an der durch PDGF stimulierten Aktinreorganisation beteiligt, wie an Migration, Wachstum und der Hemmung der Zellapoptose.

Ein weiteres Signalprotein, das an den PDGF β -Rezeptor binden kann, ist die PLC γ . Zu dieser Familie der Phosphatid-spaltenden Enzyme gehören neben PLC γ , auch PLC β , PLC δ und PLC ϵ (Kelley et al., 2001; Lopez et al., 2001). Zwei Isoformen der PLC γ - PLC γ 1 und PLC γ 2 - sind bekannt. Das PLC γ -Molekül besitzt eine durch zwei SH2- und eine SH3-Domäne unterbrochene PH-Domäne und eine weitere N-terminale PH-Domäne. PLC γ 1 wird ubiquitär exprimiert, während die Expression von PLC γ 2 auf Milz und Thymus beschränkt ist (Kamat und Carpenter, 1997). PLC γ 1 kann an die phosphorylierten Tyrosinreste 1021 und 1009 des PDGF β -Rezeptors binden und wird durch Phosphorylierung eigener Tyrosinreste aktiviert. Substrat der PLC γ ist Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), das schließlich zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) gespalten wird. IP₃ stimuliert die Ca²⁺-Mobilisierung aus intrazellulären Speichern und DAG die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) (Berridge, 1993).

Auch Src, ein typischer Vertreter der Src-Tyrosinkinase Familie, bindet an den PDGF β -Rezeptor und zwar an die Phosphotyrosinreste 579 und 581 in der juxtamembranären Domäne und wird im folgenden selbst an mehreren Tyrosinresten phosphoryliert und dadurch aktiviert (Mori et al., 1993). Src-Kinasen sind an der Regulation von Zellwachstum und Migration beteiligt.

Zu den Adapterproteinen gehört Grb2, das eine SH2- und zwei SH3-Domänen besitzt. Grb2 ist über seine SH3-Domäne in einem konstitutiven Komplex mit dem Nukleotid-Austauschfaktor Son of sevenless (Sos) assoziiert. Das Grb2-Molekül bindet über seine SH2-Domäne an den Phosphotyrosinrest 716 im Kinase-Insert des PDGF β -Rezeptors, wird aber nicht phosphoryliert. Man nimmt an, daß die Bindung an den Rezeptor dazu dient, den Grb2-

Sos-Komplex in die Nähe der Zellmembran in engen Kontakt zu Ras zu bringen. Ras*GDP wird durch Sos in den aktivierten Ras*GTP-Zustand konvertiert. Ras*GTP wiederum bindet und aktiviert Raf, die erste Serin/Threonin- Kinase in der MAP-Kinase-Kaskade. Grb2 kann auch indirekt über das Adaptermolekül Shc an den PDGF β -Rezeptor binden. Das Shc-Molekül wird nach Bindung an den PDGF β -Rezeptor (Position 579, 740, 751 und 771) am Tyrosinrest 317 phosphoryliert, wodurch die Bindung an den Grb2-Sos-Komplex ermöglicht wird (Claesson-Welsh, 1994; Heldin et al., 1998).

Das GTPase aktivierende Protein (GAP) besitzt zwei SH2-Domänen und bindet an Tyrosinrest 771 in der Kinase-Domäne des PDGF β -Rezeptor und wird daraufhin selbst an Tyrosinresten phosphoryliert (Fantl et al., 1992). GAP deaktiviert Ras, indem es die Hydrolyse von Ras-gekoppelten GTP stimuliert.

Die Tyrosinphosphatase SHP-2 (ehemals PTP1D oder SH-PTP2), die zwei SH2-Domänen besitzt, bindet an Tyrosinrest 1009 des PDGF β -Rezeptors. Dadurch kommt es zu einem Anstieg der Phosphatase-Aktivität. Infolge der Bindung an den Rezeptor wird SHP-2 an Tyrosinresten phosphoryliert und bietet eine weitere Bindungsstelle für Grb2. Es wird vermutet, daß durch die indirekte Bindung von Grb2 über SHP-2 an den PDGF β -Rezeptor ein weiterer, zelltypspezifischer Signalweg zu Ras eingeleitet wird (Li et al., 1994). Als Tyrosinphosphatase führt SHP-2 zu einer Dephosphorylierung des aktivierten PDGF-Rezeptors und seiner Substrate (Klinghoffer und Kazlauskas, 1995).

Es gibt noch weitere Signalproteine, die direkt an den PDGF-Rezeptor binden können, dazu gehören Stat-Transkriptionsfaktoren und das Adapterprotein Nck. Ihre Funktion ist noch nicht vollständig geklärt.

Bei der Signaltransduktion über klassische RTK handelt es sich um einen paradigmatischen Signalweg einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren. Im folgenden soll ein anderer paradigmatischer Signalübertragungsweg beschrieben werden, der zumindest von der Zahl der vorkommenden Rezeptoren (>1000 Mitglieder; Hall et al., 1999) der häufigste ist: die Signalübertragung über heterotrimere G-Proteine.

1.2.3. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und heterotrimere G-Proteine: Struktur und Funktion

Eine Vielzahl von Signalen, die die Zelle u.a. über Hormone oder Neurotransmitter, aber auch durch Geruchs- und Lichtreize erreichen, werden durch GPCR vermittelt. GPCR gehören zur Familie der integralen Membranproteine. Da sie die Zellmembran siebenmal durchqueren, werden sie auch als heptahelikale Rezeptoren bezeichnet. Heterotrimere G-Proteine leiten die Signale, die über die Bindung von Liganden an GPCR induziert werden, in die Zelle weiter.

Heterotrimere G-Proteine lassen sich in vier große Familien unterteilen: G_s , $G_{i/o}$, G_q und G_{12} (Simon et al., 1991). Sie bestehen aus α (39 - 52 kDa)-, β (~36 kDa)- und γ (8 kDa)-Untereinheit. Zur Zeit sind dreiundzwanzig verschiedene α -Untereinheiten (Gudermann et al., 1997), sechs β -Untereinheiten und dreizehn γ -Untereinheiten (Hamm, 1998; Huang et al., 1999) bekannt.

Die α -Untereinheit besitzt zwei Domänen. Die Ras-ähnliche GTPase-Domäne wird aus einem sechs-strängigen β -Faltblatt (β_1 - β_6), das von sechs Helices (α_1 - α_6) umgeben ist, gebildet. Diese Domäne ist für die Bindung und Hydrolyse von GTP verantwortlich. Innerhalb dieser Domäne liegen auch die sogenannten „switch“-Regionen (I, II und III), die je nach Guanin-Nukleotid-Bindungszustand ihre Konformation ändern; ebenso befinden sich hier die Bindungsstellen zur $G\beta\gamma$ -Untereinheit, zum Rezeptor und zu den Effektoren. Die N-terminale α -helikale Domäne besteht aus einer langen, zentralen Helix und fünf kürzeren Helices. Auch diese Domäne ist an der Bindung der $G\beta\gamma$ -Untereinheit beteiligt (Gudermann et al., 1997).

Die β -Untereinheit besitzt eine N-terminale α -Helix und sieben regelmäßige WD-Domänen, die einen siebenblättrigen, ringförmig angeordneten „Propeller“ bilden. Die einzelnen Domänen dieses Propellers sind jeweils aus einem vier-strängigen β -Faltblatt zusammengesetzt. WD-Domänen besitzen einen Kern aus 40 Aminosäuren, der durch die Aminosäuren Glycin-Histidin (GH) und Tryptophan-Asparaginsäure (WD) charakterisiert ist und eine Sequenz von variabler Länge aufweist. Aufgrund dieser Struktur werden $G\beta$ -Proteine auch zur Familie der WD-Proteine gezählt (Clapham und Neer, 1997; Sondek et al., 1996).

Die $G\gamma$ -Untereinheit ist über weite Bereiche eng mit der β -Untereinheit assoziiert. Die beiden Untereinheiten werden auch als ein funktionelles Monomer bezeichnet, da sie sich *in vivo* nicht trennen lassen. Die N-terminale Helix der γ -Untereinheit ist in Spiral-ähnlicher Weise mit der N-terminalen Helix der $G\beta$ -Untereinheit assoziiert („coiled coil“). Der übrige Teil des

G γ -Moleküls tritt mit den β -Faltblättern bzw. WD-Domänen 5, 6, 7 und 1 der G β -Untereinheit in Kontakt (Neer und Smith, 1996). G γ -Untereinheiten werden post-translational am C-Terminus durch Isoprenylierung modifiziert. Es wird angenommen, daß die Lipidmodifikation der G γ -Untereinheit der Verankerung des G $\beta\gamma$ -Dimers in der Membran dient, aber auch für die Interaktion mit Effektoren, G α -Untereinheiten und Rezeptoren von Bedeutung ist (Gautam et al., 1998). Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß die Bindungsstellen des G $\beta\gamma$ -Dimers zu Effektoren teilweise mit den Regionen überlappen, an die im Heterotrimer die G α -Untereinheit gebunden ist (Chen et al., 1997). Weiterhin werden die N-terminale „coiled coil“-Struktur (Yan und Gautam, 1997) und die WD-Domänen 1 und 7 der G β -Untereinheit als Interaktionsstellen mit Effektoren diskutiert (Yamauchi et al., 1997).

Im Ruhezustand, wenn die α -Untereinheit GDP gebunden hat, bilden die drei Untereinheiten ein inaktives Heterotrimer, das an den Rezeptor gebunden ist. Wird der Rezeptor durch ein eintreffendes Signal bzw. einen Liganden aktiviert, ändert er seine Konformation und stimuliert die Freisetzung des an die α -Untereinheit gebundenen GDP. GDP wird gegen GTP, das im Zytosol in höheren Konzentrationen vorliegt, ausgetauscht. Dadurch kommt es zu Konformationsänderungen in der G α -Untereinheit („switch“-Regionen) und die Affinität zur G $\beta\gamma$ -Untereinheit nimmt ab. Schließlich dissoziiert die α -Untereinheit von der G $\beta\gamma$ -Untereinheit und vom Rezeptor (Neer, 1995; Clapham and Neer, 1997). Die α -Untereinheit bleibt solange aktiviert, bis die intrinsische GTPase-Aktivität GTP zu GDP hydrolysiert. Es kommt dann zu einer Reassoziierung von G α - und G $\beta\gamma$ -Untereinheit und das Heterotrimer bindet erneut an den Rezeptor (siehe Abb. 1.4.).

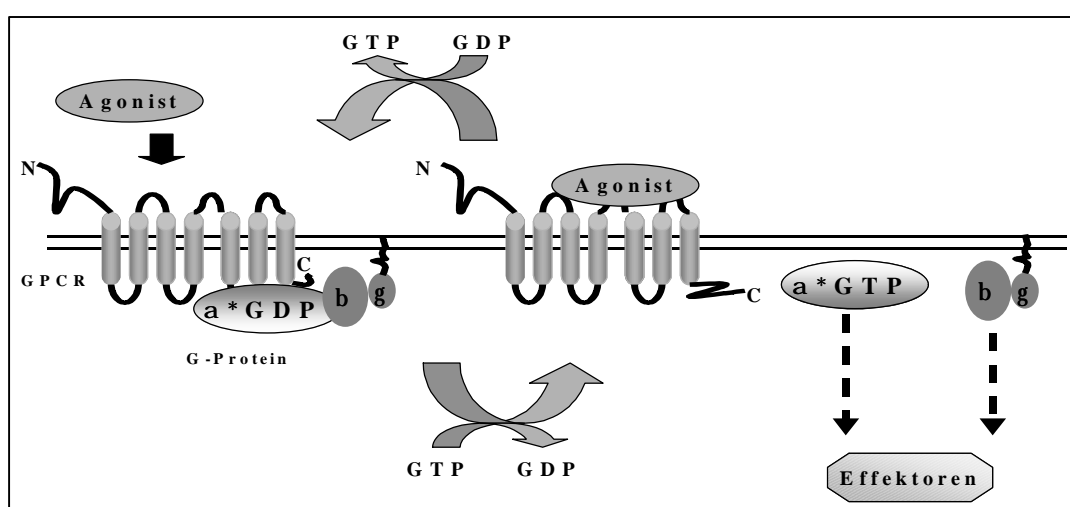


Abb. 1.4: Regulatorischer Zyklus heterotrimerer G-Proteine

Vor einiger Zeit erst wurde gezeigt, daß nicht nur die aktivierte $G\alpha$ -Untereinheit Effektorsysteme (u.a. PLC β und Adenylylzyklase) moduliert, sondern auch das aktivierte $G\beta\gamma$ -Dimer. So ist die $G\beta\gamma$ -Untereinheit ein Regulator für eine Reihe von Effektoren, zu denen Adenylylzyklase-Isoformen, PLC β , Phospholipase A_2 (PLA $_2$), PI3-Kinase, Bruton's Tyrosinkinase (BTK) und β -Adrenorezeptorkinase (β -ARK) gehören (Clapham und Neer, 1997). Zudem aktiviert das $G\beta\gamma$ -Dimer über Ras die MAP-Kinase-Kaskade, auf die noch näher eingegangen werden soll (Crespo et al., 1994). Viele Effektoren werden sowohl von $G\alpha$ - als auch von $G\beta\gamma$ -Untereinheiten reguliert, der Regulationsmechanismus ist dabei abhängig von den jeweiligen Effektor-Isoformen (Tang und Gilman, 1991).

Einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis von G-Protein vermittelten Signalmechanismen haben bestimmte Bakterientoxine wie z.B. Pertussistoxin (PTX) geleistet, auf das an dieser Stelle eingegangen werden soll.

1.2.4. PTX-sensitive G-Proteine

PTX ist ein hexameres Protein, das vom Keuchhustenerreger *Bordetella pertussis* synthetisiert wird. Es setzt sich aus zwei verschiedenen Einheiten zusammen, dem enzymatisch aktiven A-Protomer (26 kDa) und dem B-Oligomer (78 kDa). Das B-Oligomer ist für die Bindung an die Membran der Zielzelle und für das Einschleusen des Toxins verantwortlich. PTX katalysiert die ADP-Ribosylierung der α -Untereinheiten bestimmter heterotrimerer G-Proteine. Dabei wird durch die Aktivität der ADP-Ribosyltransferase des A-Protomers der Transfer von ADP-Ribose von NAD^+ an C-terminal gelegene Cysteinreste von $G\alpha$ -Untereinheiten katalysiert (Gierschik und Jakobs, 1992). Konsequenz ist die Entkopplung des betreffenden G-Proteins von seinem Rezeptor und die Hemmung der Rezeptor-vermittelten Stimulation weiterer Effektorsysteme (Kopf und Woolkalis, 1991). G-Proteine, die durch PTX inaktiviert werden, werden als PTX-sensitiv bezeichnet. Dazu gehören die $G_{i/o}$ -Proteine, allerdings nicht G_z . G-Proteine der Familien G_q , G_s und G_{12} werden nicht durch PTX modifiziert, man bezeichnet sie daher als PTX-insensitive Proteine.

Ein wichtiges Effektorsystem, das wir eingehender untersucht haben und an dessen Aktivierung auch GPCR und G-Proteine beteiligt sind, ist die MAP-Kinase-Kaskade. Im folgenden sollen die verschiedenen Mechanismen, die zur Aktivierung der MAP-Kinase-

Kaskade durch Stimulation von RTK und GPCR führen, dargestellt werden. Zudem wird hier deutlich, daß die Signaltransduktion über RTK und GPCR nicht als separate Mechanismen betrachtet werden können, daß vielmehr ein „Cross talk“ zwischen beteiligten Signal-komponenten erfolgt.

1.3. Die MAP-Kinasen

MAP-Kinasen gehören zu den Serin/Threonin-Kinasen und kommen in allen Mammalierzellen vor. Die MAP-Kinasen lassen sich in drei Unterfamilien gliedern: a) ERK („Extracellular Signal Regulated Kinase“), ursprünglich unter der Bezeichnung MAP-Kinase bekannt geworden, ERK1 bzw. p44 mapk (44 kDa) und ERK2 bzw. p42 mapk (42 kDa); b) JNK („c-Jun N-terminal Kinase“) oder SAPK („Stress-Activated Protein Kinase“); c) p38 MAP-Kinase.

MAP-Kinasen (ERK1/2) sind Schlüsselenzyme in der Regulation von Zellwachstum, -teilung und -differenzierung, während die beiden anderen Kinase-Familien (JNK, p38 MAP-Kinasen) an Stressantworten der Zelle beteiligt sind. Im folgenden sind MAP-Kinasen synonym zu ERK1/2 gemeint.

Nach der Aktivierung wandert die MAP-Kinase zum Kern und aktiviert Transkriptionsfaktoren, woraufhin DNA-Synthese und Zellteilung eingeleitet werden. Neben den Transkriptionsfaktoren im Zellkern gehören zu den Substraten der MAP-Kinase im Zytoplasma u.a. Translationsfaktoren (Proud, 1994), PLA₂ (Lin et al., 1993) oder Proteinphosphatase 2C (Peraldi et al., 1994). Außerdem werden auch Strukturproteine wie Myelin Basic Protein (MBP) von MAP-Kinasen phosphoryliert (Erickson et al., 1990).

Die MAP-Kinase-Kaskade setzt sich aus den Kinasen Raf („MAP-Kinase Kinase Kinase“), MEK1/MEK2 („MAP-Kinase Kinase“) und ERK1/ERK2 („MAP-Kinasen“) zusammen, die in Folge aktiviert werden. Die Aktivierung dieser Kaskade verläuft über zelltypspezifische Signalwege, an deren Beginn RTK oder GPCR stehen. Während bei der Aktivierung der MAP-Kinasen durch RTK die intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität für die Signalweiterleitung verantwortlich ist, nimmt man für die Aktivierung, die durch GPCR vermittelt wird, die Beteiligung von zellulären Nichtrezeptor-Tyrosinkinasen und / oder RTK an (van Biesen et al., 1996).

1.3.1. Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade über RTK

Nach Stimulation durch Peptidwachstumsfaktoren wie PDGF oder EGF kann Grb2 direkt oder indirekt über Shc an die aktivierte RTK binden und das Signal über den bereits beschriebenen Weg zu Ras (siehe 1.2.2.2.) weiterleiten. Aktiviertes Ras assoziiert mit Raf, initiiert dessen Aktivierung und setzt dadurch die MAP-Kinase-Kaskade in Gang, die schließlich zur Stimulation der ERK1/2-Aktivität führt (van Biesen et al., 1996).

Es wird auch die Beteiligung der Proteinphosphatase SHP-2 an der durch PDGF stimulierten MAP-Kinase-Aktivierung diskutiert (Zhao und Zhao, 1999). Ob SHP-2 in seiner Funktion als Adaptermolekül zwischen aktiviertem Rezeptor und Grb2 zur MAP-Kinase-Aktivierung führt (Li et al., 1994), oder ob durch SHP-2 andere Mechanismen eingeleitet werden, ist noch unklar.

1.3.2. Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade über GPCR

Die Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade ist für eine Vielzahl von Liganden (u.a. LPA, Thrombin, Bradykinin), die GPCR stimulieren, beschrieben worden. Der darauf folgende intrazelluläre Signalweg bis zur Aktivierung der MAP-Kinasen ist zelltypspezifisch und von den beteiligten PTX-sensitiven bzw. -insensitiven G-Proteinen und den verfügbaren Effektoren in der betreffenden Zelle abhängig. Eingehend untersucht wurden insbesondere die MAP-Kinase-Aktivierungsmechanismen, die über GPCR, die an G_i -oder G_q -Proteine koppeln, stimuliert werden. Gemeinsam ist diesen Aktivierungsmechanismen die Beteiligung von Mitgliedern der Src-Kinase Familie. Diese können zusammen mit zelltypspezifischen Tyrosinkinasen wie Pyk 2 oder RTK spezifische Signale von G_i - und G_q -Proteinen zu Shc weiterleiten, wodurch die bereits beschriebene MAP-Kinase-Aktivierung über Ras eingeleitet wird (Dikic, 1998). Diese Aktivierungsmechanismen sollen im folgenden kurz vorgestellt werden.

1.3.2.1. Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade durch Stimulation von GPCR, die an PTX-insensitive G-Proteine koppeln

Bei der Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade über GPCR, wie dem muskarinergen Acetylcholinrezeptor (m_1mAChR) oder dem α_{1B} Adrenozeptor (AR), die an PTX-insensitive G_q -

Proteine koppeln, werden die Signale über die $G\alpha$ -Untereinheit vermittelt, sie können aber durch die $G\beta\gamma$ -Untereinheit moduliert werden (siehe Abb. 1.5.).

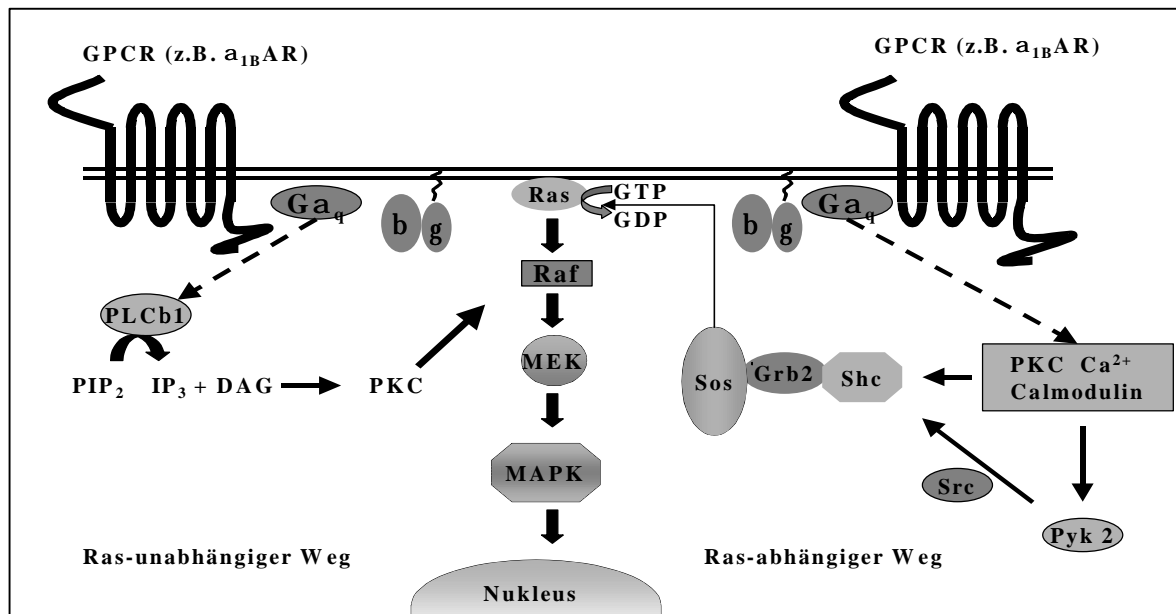


Abb. 1.5: Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade über PTX-insensitive G-Proteine
(Erläuterungen folgen im Text)

In neuronalen PC12-Zellen wurde die Beteiligung einer Ca^{2+} -abhängigen Tyrosinkinase, Pyk 2, die zur FAK („Focal Adhesion Kinase“) Familie gehört, an der Ras-abhängigen MAP-Kinase-Aktivierung beschrieben (Lev et al., 1995). Pyk 2 konnte durch aktivierte PKC oder durch einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration infolge einer Stimulation mit Bradykinin aktiviert werden. Die aktivierte Pyk 2 initiiert dann durch direkte oder indirekte (über Shc) Bindung von Grb2 die Signalkaskade. Von Dikic et al. (1996) konnte weiterhin gezeigt werden, daß Pyk 2 zu einer Aktivierung von Src in PC12-Zellen führt. In COS-7- und CHO-Zellen konnte eine Ras-unabhängige MAP-Kinase-Aktivierung beschrieben werden (Koch et al., 1994; Hawes et al., 1995). Es wird angenommen, daß die Stimulation der MAP-Kinase hier von aktivierter $PLC\beta$ zur PKC und schließlich zu Raf verläuft. Es wird auch vermutet, daß eine Ca^{2+} / Calmodulin-sensitive Tyrosinkinase eine Rolle bei der Aktivierung der MAP-Kinase einnimmt (Castoria et al., 1993).

1.3.2.2. Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade durch Stimulation von GPCR, die an PTX-sensitive G-Proteine koppeln

Eine Vielzahl von Untersuchungen konnte zeigen, daß die MAP-Kinase-Aktivierung durch GPCR wie α_{2A} AR, m_2 mAChR, LPA- oder Thrombin-Rezeptor, die an G_i -Proteine koppeln, über $G\beta\gamma$ -Untereinheiten vermittelt wird (Crespo et al., 1994; Koch et al., 1994).

$G\beta\gamma$ -Dimere regulieren die Aktivität von Tyrosinkinasen der Src-Familie (Luttrell et al., 1996), die dann wiederum eine Reihe von Substraten phosphorylieren. Dazu gehören das Shc-Adapterprotein und RTK wie PDGF- oder EGF-Rezeptor (Linseman et al., 1995). Dadurch wird der bereits beschriebene Signalweg zu Ras eingeleitet (siehe Abb. 1.6.).

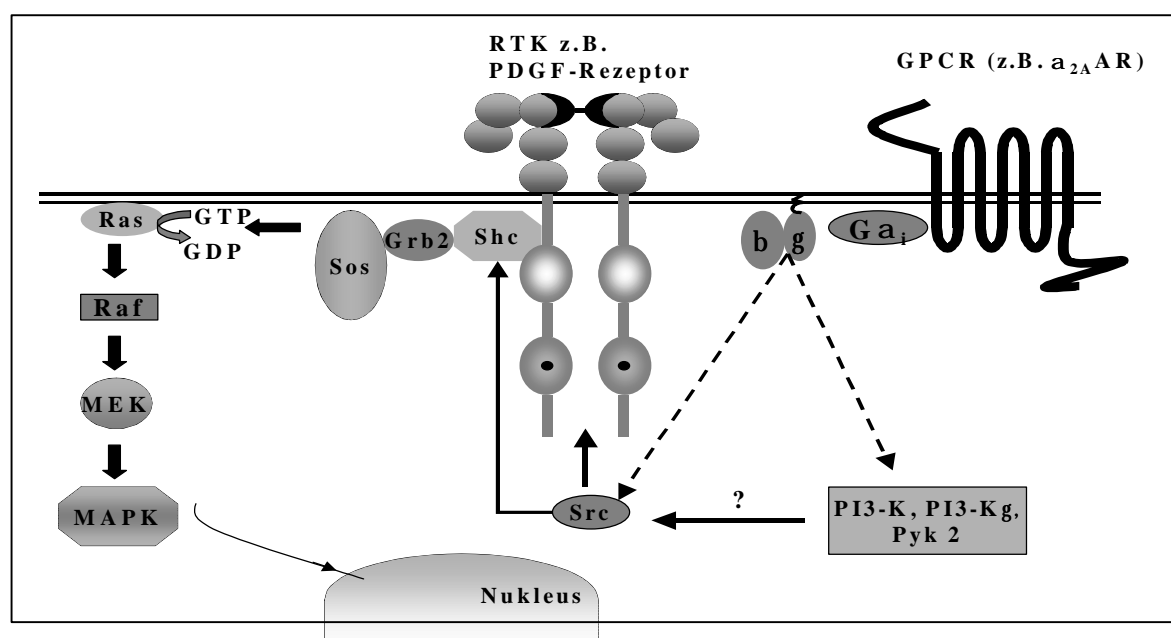


Abb. 1.6.: Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade über PTX-sensitive G-Proteine (Erläuterungen folgen im Text).

Bei diesem durch G_i -Proteine vermittelten Aktivierungsmechanismus wird deutlich, daß RTK und GPCR die Ras-Aktivierung über konvergente Signalwege induzieren können. Es gibt sogar Untersuchungen, die eine Liganden-unabhängige Transaktivierung von RTK durch GPCR-vermittelte Signale wahrscheinlich machen. An glatten Gefäßmuskelzellen von Ratten konnte gezeigt werden, daß Angiotensin II wie PDGF die Tyrosinphosphorylierung des PDGF β -Rezeptors stimuliert und über die Phosphorylierung von Shc die Komplexbildung mit Grb2 einleiten kann (Linseman et al., 1995). Vergleichbare Ergebnisse konnten von Daub et al. (1997) an Rat-1 Fibroblasten gezeigt werden. Es wurde eine Zunahme der Phosphorylierung des EGF-Rezeptors und eine Komplexbildung von EGF-Rezeptor, Shc und Grb2-Sos nach Stimulation mit den GPCR-Agonisten Endothelin, LPA und Thrombin beobachtet.

Generell wird angenommen, daß Src-Kinasen an dieser Aktivierung der RTK beteiligt sind. Für den EGF-Rezeptor konnte in COS-7-Zellen eine direkte Assoziation mit und eine Phosphorylierung durch Src-Kinasen nach Stimulation von GPCR, die an G_i -Proteine koppeln, nachgewiesen werden (Luttrell et al., 1997).

Wie nun die Aktivierung der Src-Kinasen verläuft, ist noch nicht vollständig verstanden. Angenommen wird u.a. die Beteiligung der PI3-Kinase bzw. einer neuen Isoform, PI3-Kinase γ (Lopez-Illasaca et al., 1997). Weiterhin wird diskutiert, ob $G\beta\gamma$ -Untereinheiten, zusammen mit Produkten (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat) der PI3-Kinasen, Src-Kinasen in analoger Weise zur Regulation von β -ARK aktivieren (Luttrell et al., 1996).

In PC12-Zellen konnte gezeigt werden, daß LPA die Aktivierung von Pyk 2 über G_i -Proteine stimuliert, was in Folge zur Aktivierung von Src führt (Dikic et al., 1996). Pyk 2 ist aber nicht nur, wie zunächst angenommen, in neuronalen Geweben aktiv. Für COS-7- und HEK 293-Zellen wurde beobachtet, daß die $G\beta\gamma$ - (und auch die $G\alpha_{q/11}$ -) abhängige Aktivierung der PLC β über einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration schließlich zu einer Aktivierung von Pyk 2 führt. Pyk 2 aktiviert dann wiederum Src und leitet den Signalweg zur MAP-Kinase ein (Della Rocca et al., 1997).

Aber auch α -Untereinheiten von G_i -Proteinen haben die Möglichkeit MAP-Kinasen zu stimulieren. Für G_{ip2} -Onkogene, die für eine konstitutiv aktive $G\alpha_{i2}$ -Mutante kodieren, konnte gezeigt werden, daß die MAP-Kinasen über einen Ras-unabhängigen Mechanismus konstitutiv stimuliert werden (Gupta et al., 1992).

Es werden noch weitere Aktivierungsmechanismen für die MAP-Kinase diskutiert. So konnte erst kürzlich Hedin et al. (1999) in einer humanen T-Zelllinie für den δ -Opiod 1 Rezeptor (DOR1), der an G_i -Proteine koppelt, einen $G\beta\gamma$ -, Ras- und PI3-Kinase-unabhängigen Aktivierungsmechanismus für die MAP-Kinase nachweisen.

Weiterhin konnte die Aktivierung der MAP-Kinase auch ohne Vermittlung eines membranständigen Rezeptors nachgewiesen werden. Es wurde beobachtet, daß die direkte Aktivierung der PKC durch Phorbol ester über einen Ras-unabhängigen und Ras-abhängigen Mechanismus zur MAP-Kinasen-Aktivierung führen kann (Hawes et al., 1995).

1.4. Beteiligung von heterotrimeren G-Proteinen an der frühen Signaltransduktion von RTK

Wie für die Aktivierung der MAP-Kinase gezeigt wurde, kommunizieren die beiden klassischen Signaltransduktionsmechanismen von RTK und GPCR miteinander. Für die frühe Signaltransduktion dieser beiden Rezeptorklassen wurden allerdings bisher separate Mechanismen angenommen (Letterio et al., 1986). Inzwischen sind aus der Literatur mehrere Untersuchungen zu RTK bekannt geworden, die eine Beteiligung heterotrimerer G-Proteine an der Signaltransduktion von RTK, und zwar bereits auf Rezeptorebene, nahe legen.

Besonders gut untersucht wurde der EGF-Rezeptor, der wie der PDGF-Rezeptor eine klassische RTK ist. Der EGF-Rezeptor besitzt kein Kinase-Insert wie der PDGF-Rezeptor. Die wichtigen Phosphorylierungsstellen liegen beim EGF-Rezeptor in der C-terminalen Region. Einer der frühen Signalwege, der durch Bindung von EGF an seinen Rezeptor initiiert wird, ist die Aktivierung der PLC γ , die zu einem Anstieg der beiden second messenger IP $_3$ und DAG führt. Dadurch wird die Ca $^{2+}$ -Mobilisierung aus intrazellulären Speichern und die Aktivierung der PKC stimuliert.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben die Beteiligung von heterotrimeren G-Proteinen an diesem Signalweg untersucht. Einer der ersten Beobachtungen hierzu wurde von Johnson et al. (1986, 1987) an primären Hepatozyten der Ratte gemacht. Es konnte eine Hemmung der EGF induzierten IP $_3$ -Bildung und der Ca $^{2+}$ -Mobilisierung durch PTX nachgewiesen werden. Weiterhin konnten Liang und Garrison (1991) an Membranen von Leberzellen der Ratte beobachten, daß PTX die durch EGF stimulierte [35 S]-GTP γ S-Bindung (einem GTP-Analogon) und die [α - 32 P]GDP-Dissoziation von G-Proteinen hemmt. Einen Schritt weiter gingen Yang et al. (1991), die nach EGF-Stimulation primärer Hepatozyten in Immunpräzipitaten der PLC γ bzw. des EGF-Rezeptors eine vorübergehende Zunahme von 41 kDa G α_i -Untereinheiten zeigen konnten. In einer späteren Untersuchung (Yang et al., 1993) wurde der Nachweis geführt, daß die Phosphorylierung durch den EGF-Rezeptor für die Aktivierung der PLC γ nicht ausreichend ist; eine Assoziation von PLC γ mit G α_i -Proteinen stellte sich als erforderlich heraus. Die Beteiligung von G $_i$ -Proteinen an der durch EGF stimulierten PLC γ -Aktivierung wurde weiterhin durch Experimente belegt, bei denen die Mikroinjektion von anti-G α_i -Antikörpern die durch EGF induzierten Ca $^{2+}$ -Signale hemmte (Yang et al., 1993). Zudem konnte gezeigt werden, daß es nach Stimulation mit EGF zu einer Translokation von tyrosinphosphorylierter PLC γ zusammen mit G $_i$ -Proteinen an das Zyto-

skelett kommt (Yang et al., 1994). Auch an primären Nierentubuluszellen konnte eine PTX-Sensitivität für die durch EGF induzierte PIP_2 -Hydrolyse beobachtet werden. Die in Anwesenheit von $\text{GTP}\gamma\text{S}$ verstärkten EGF-Signale konnten ebenfalls durch PTX gehemmt werden (Teitelbaum et al., 1990).

Weiterhin konnte an Pankreasmembranen der Ratte nach Stimulation mit EGF ein gesteigerter Einbau eines Photoaffinitäts-markierten GTP-Analogons in ein 41 kDa-Protein gezeigt werden (Pröfrock et al., 1991). Piiper et al. (1997) wiesen in Pankreasdrüsenzellen eine Koimmunpräzipitation von $\text{G}\alpha_i$ -Proteinen mit dem EGF-Rezeptor bzw. der $\text{PLC}\gamma$ nach. Nach Stimulation dieser Zellen mit EGF kam es zu einer vorübergehenden Zunahme mit dem EGF-Rezeptor bzw. der $\text{PLC}\gamma$ kopräzipitierender $\text{G}\alpha_i$ -Proteine.

Wurden Versuche dieser Art mit permanenten oder transformierten Zellen, u.a. A431-Zellen (Pike und Eakes, 1987), 3T3-Fibroblasten (Taylor et al., 1988) oder WB-Zellen (Hepler et al., 1990) durchgeführt, so bestand keine PTX-Sensitivität für die durch EGF stimulierte $\text{PLC}\gamma$ -Aktivierung. Diese Befunde belegen, daß es hinsichtlich der Beteiligung PTX-sensitiver G-Proteine an der Signaltransduktion von EGF wesentliche zelltypabhängige Unterschiede gibt. Interessanterweise scheint es diese PTX-Sensitivität besonders bei Zellen aus der Primärkultur (Leberzellen, Nierentubuluszellen) zu geben, während sie bei Zelllinien (Hepatomazellen, 3T3-Fibroblasten, A431 epidermoide Karzinomzellen) offensichtlich fehlt. Weitere Hinweise zur Beteiligung heterotrimerer G-Proteine finden sich auch für andere RTK. So konnte in Adipozyten der Ratte nach Stimulation mit Insulin eine Assoziation des Insulinrezeptors mit einem 41 kDa G-Protein gezeigt werden (Jo et al., 1993). An murinen BC3H-1 Myozytenmembranen hemmte eine Behandlung mit PTX die durch Insulin stimulierte GTP-Hydrolyse, $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung sowie die Insulinbindung an den Insulinrezeptor (Luttrell et al., 1990). Diese Effekte von PTX korrelierten mit einer parallelen ADP-Ribosylierung eines 40 kDa $\text{G}\alpha$ -Proteins in diesen Membranen (Luttrell et al., 1990).

Neueste Befunde zum IGF-I-Rezeptor, der ein naher Verwandter des Insulinrezeptors ist, belegen eine konstitutive Assoziation des IGF-I-Rezeptors mit PTX-sensitiven G-Proteinen (Hallak et al., 2000).

Besonders interessant sind die Befunde zum CSF-1-Rezeptor, als nächsten Verwandten des PDGF-Rezeptors (siehe Tabelle 1.1.). Imamura und Kufe (1988) beobachteten eine Zunahme der $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung und eine erhöhte GTPase-Aktivität nach CSF-1-Stimulation in humanen Monozytenmembranen. Sowohl die durch CSF-1 stimulierte GTPase-Aktivität, der Na^+ -Influx, die Na^+ , K^+ -ATPase-Aktivität als auch die DNA-Synthese waren PTX-sensitiv. Corre

und Hermouet (1995) konnten eine Beteiligung von $G\alpha_{i2}$ an der durch CSF-1 stimulierten Zellproliferation von BAC 1.2F5-Zellen, einer Makrophagenlinie aus Maus, nachweisen. Weiterhin wurde von Whitman et al. (2000) gezeigt, daß die Stimulation von Makrophagen mit CSF-1 zu einem verstärkten Lipoprotein-Metabolismus führt, der über die Aktivierung von $G_{i/o}$ -Proteinen verläuft.

Zum PDGF-Rezeptor selbst gibt es wenig Datenmaterial. Huang und Ives (1989) beobachteten an permeabilisierten glatten Gefäßmuskelzellen der Rattenaorta einen Anstieg der durch PDGF stimulierten IP_3 -Bildung nach $GTP\gamma S$ -Behandlung. $GDP\beta S$, ein GDP-Analogon, wiederum führte zu einer Abnahme der durch PDGF stimulierten IP_3 -Bildung. Zhang et al. (1994) konnten beim durch PDGF- bzw. durch Serum stimulierten Wachstum glatter Gefäßmuskelzellen eine Hemmung durch PTX nachweisen. Choudhury et al. (1994) beobachteten an humanen Mesangiumzellen zwar keinen Effekt von PTX auf die durch PDGF induzierte Aktivierung der PI3-Kinase, dafür aber eine Hemmung der durch PDGF stimulierten DNA-Synthese in Anwesenheit von PTX.

Erst kürzlich, nach Abschluß der eigenen experimentellen Untersuchungen, konnte von Conway et al. (1999) der Nachweis geführt werden, daß PTX-sensitive G-Proteine an der durch PDGF stimulierten Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade an der glatten Muskulatur der Atemwege beteiligt sind.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Für PDGF ist die Frage nach einer Beteiligung von G-Proteinen an der frühen Signaltransduktion weitestgehend unbeantwortet. Den Anstoß zu der hier dargestellten Arbeit gaben vorausgegangene Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe an primären Hautfibroblasten. Diese Untersuchungen befaßten sich mit genetisch fixierten Unterschieden in der Signaltransduktion bei Patienten mit essentieller Hypertonie im Vergleich zu gesunden Probanden. Hierbei ergaben sich deutliche Unterschiede in den Ca^{2+} -Signalen und der DNA-Synthese von Hautfibroblasten hypertensiver Spender nach Stimulation mit Agonisten, deren Signaltransduktion PTX-sensitive G-Proteine einschließt (Pietruck et al., 1996). So wurden bei Fibroblasten hypertensiver Spender jeweils höhere Signale gemessen. Nach Vorbehandlung der Zellen mit PTX waren diese Unterschiede dann jedoch nicht mehr nachweisbar. Dies führte zu der Vermutung, daß Veränderungen in PTX-sensitiven G-Proteinen bei Hypertonikern zu einer gesteigerten Signaltransduktion führen (Pietruck et al., 1996).

Überraschenderweise führte auch eine Stimulation der Hautfibroblasten mit PDGF zu einer erhöhten DNA-Synthese und zu 50 % höheren Ca^{2+} -Signalen bei Bluthochdruck-Patienten. Auch im Falle von PDGF wurden die Unterschiede in den Signalen zwischen Zellen von Hypertonikern und Gesunden durch eine Vorbehandlung der Zellen mit PTX aufgehoben.

Ausgehend von diesem ersten Hinweis auf eine Beteiligung PTX-sensitiver G-Proteine an der Signaltransduktion von PDGF und in Anlehnung an die Befunde zum EGF-Rezeptor von Yang et al. (1991, 1993 und 1994) sollten im Rahmen dieser Arbeit folgende Aspekte am Zellkultur-Modell primärer humaner Hautfibroblasten untersucht werden:

- der Einfluß von PTX auf die durch PDGF stimulierte intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisierung,
- eine mögliche direkte Assoziation von PDGF-Rezeptor und G_i -Proteinen und der Einfluß von PDGF auf diese Interaktion,
- eine mögliche direkte Assoziation von $\text{PLC}\gamma$ und G_i -Proteinen und der Einfluß von PDGF auf diese Interaktion.

Neben diesen Untersuchungen an primären Hautfibroblasten sollten dort gefundene Effekte auch an permanenten Mausfibroblasten analysiert werden, um zu untersuchen, ob es wie im Falle des EGF-Rezeptors, auch beim PDGF-Rezeptor ausgeprägte zelltypabhängige Einflüsse gibt.

Schließlich sollte an humanen Hautfibroblasten auch der Effekt einer PTX-Behandlung auf spätere Zellantworten nach Stimulation mit PDGF untersucht werden. Hierzu wurde die Proliferation und die Chemotaxis von Hautfibroblasten unter PDGF analysiert.

Im Verlauf dieser Arbeit ergaben sich durch die weitere vergleichende Erforschung der oben beschriebenen primären Hautfibroblasten von Hypertonikern und gesunden Probanden neue interessante Aspekte. So wurde von Siffert et al. (1998) ein Polymorphismus im Gen der G-Proteinuntereinheit $\text{G}\beta 3$ entdeckt. An der Position 825 (bezogen auf das Startcodon ATG der cDNA) im Exon 10 des $\text{G}\beta 3$ -Gens (*GNB3*) wurde ein Basenaustausch von C gegen T festgestellt (C825T). Die Primärstruktur des $\text{G}\beta 3$ -Proteins wird dadurch nicht verändert, aber das Vorkommen des *GNB3* 825T-Allels ist mit dem Auftreten einer Variante des $\text{G}\beta 3$ -Proteins, $\text{G}\beta 3\text{s}$, assoziiert. Wie bereits ausgeführt, besitzen $\text{G}\beta$ -Proteine und somit auch $\text{G}\beta 3$ sieben sogenannte WD-Domänen. $\text{G}\beta 3\text{s}$, das durch alternatives Spleißen entsteht, fehlt eine dieser WD-Domänen. Im Hinblick auf die gesteigerte Signaltransduktion von Trägern des 825T-

Allels, die auch PDGF-Signale mit umfaßt (Pietruck et al., 1996), sollte daher im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht werden,

- ob es sich bei G β 3s um ein biologisch funktionell aktives G β -Protein handelt, welches fähig ist bestimmte Effektorsysteme, wie z.B. die MAP-Kinase-Kaskade, zu aktivieren,
- ob G β 3 bzw. G β 3s an PTX-sensitiven Signaltransduktionsvorgängen nach Stimulation mit PDGF beteiligt sind.

Die hier gefundenen Ergebnisse belegen, daß PTX-sensitive G-Proteine mit dem PDGF-Rezeptor und der PLC γ interagieren können und für eine effektive Signalübertragung primärer Hautfibroblasten nach Stimulation mit PDGF von großer Bedeutung sind.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

2.1.1.1. Chemikalien, Feinchemikalien und Lösungsmittel

Acrylamidlösung (Rotiphorese Gel 40)	Roth, Karlsruhe
Adenosin 5' - triphosphat (Natriumsalz)	Serva, Heidelberg
Adenosin 5' - triphosphat (Lithiumsalz)	Boehringer, Mannheim
Agarose	Life Technologies, Eggenstein
Albumin (Fraktion V, bovin)	Serva, Heidelberg
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt
Aprotinin (Trasylol®)	Bayer, Leverkusen
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Benzamidin	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Desoxycholat (Natriumsalz)	Biomol, Hamburg
Digitonin	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Merck, Darmstadt
EDTA	Merck, Darmstadt
EGTA	Serva, Heidelberg
Ethanol	J.T. Baker, Deventer, NL
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Fura-2 (Acetonmethylester)	Molecular Probes, Leiden, NL
Glyzerin	Merck, Darmstadt
Glyzin	Roth, Karlsruhe
Guanosin 5' - diphosphat (Natriumsalz)	Boehringer, Mannheim
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isobutanol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
m-Kresol	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Boehringer, Mannheim
Magermilchpulver (fettrei)	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol p.a.	J.T. Baker, Deventer, NL
Methanol, technisch	Klinikumsapotheke, Essen
Myelin Basic Protein	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumorthovanadat	Sigma, Deisenhofen
Nicotinamid Adenin Dinukleotid	Boehringer, Mannheim
Nonidet P-40 (NP-40)	Serva, Heidelberg

Pepstatin A	Boehringer, Mannheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
Protein A-Agarose (Suspension)	St. Cruz, Californien, USA
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (konzentriert, 37 %)	Merck, Darmstadt
Sulfosalizylsäure	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Trypsininhibitor aus Sojabohne	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Fluka, Buchs, Schweiz

2.1.1.2. Inhibitoren, Agonisten und Antikörper

PTX (List Laboratories, Campbell CA, USA):

Lyophilisiertes PTX wurde in einer Konzentration von 100 µg/ml in H₂O gelöst und bei 4 °C gelagert.

Bradykinin (Sigma, Deisenhofen):

Lyophilisiertes Bradykinin wurde in einer Konzentration von 1 mM in H₂O gelöst und in geeigneten Aliquots bei -20 °C gelagert.

EGF (Sigma, Deisenhofen):

Lyophilisiertes humanes EGF wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml in 10 mM Essigsäure mit 0,1 % BSA rekonstituiert, geeignet aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

LPA (Sigma, Deisenhofen):

Lyophilisiertes LPA wurde in einer Konzentration von 1 mM in H₂O gelöst und in entsprechenden Aliquots bei -20 °C gelagert.

PDGF A/B (Sigma, Deisenhofen):

Humanes PDGF wurde als Lösung in einer Konzentration von 10 µg/ml geliefert und bei -20 °C gelagert.

SPP (Sigma, Deisenhofen):

Lyophilisiertes SPP wurde in einer Konzentration von 1 mM in 70 %igen Ethanol gelöst und in entsprechenden Aliquots bei -20 °C gelagert.

Anti-PDGF Rezeptor Typ A/B (Biomol, Hamburg):

Der anti-PDGF-Rezeptor A/B-Antikörper ist ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, der gegen die Aminosäuren 1095-1106 des humanen PDGF-Rezeptor Typ B generiert wurde. Er erkennt dieses Epitop sowohl bei PDGF-Rezeptor Typ A als auch Typ B.

Anti-PLCγ1 (Biomol, Hamburg):

Bei dem anti-PLCγ1-Antikörper handelt es sich um ein Antiserum aus Kaninchen. Dieses ist gegen die Aminosäuren 1064-1291 der PLCγ1 aus Rinderhirn generiert und zeigt eine schwache Kreuzreaktivität mit PLCγ2.

Anti-HA, Klon 12CA5 (Boehringer, Mannheim):

Hierbei handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper (Klon 12CA5) aus Maus. Der anti-HA-Antikörper erkennt die HA-Peptidsequenz (YPYDVPDYA), die vom Häm-agglutinin-Protein des humanen Influenzavirus abgeleitet ist.

Zweitantikörper (Sigma, Deisenhofen):

Abhängig vom jeweiligen Erstantikörper wurden als Zweitantikörper ein an Peroxidase gekoppelter anti-Kaninchen IgG-Antikörper aus Ziege oder ein anti-Maus IgG-Antikörper aus Ziege verwendet.

2.1.1.3. Radiochemikalien[Methyl-³H]-Thymidin

(spezifische Aktivität 6,7 Ci/mmol) Dupont-NEN, Bad Homburg

[γ-³²P]ATP

(spezifische Aktivität 3000 Ci/mmol) Hartmann Radiochemikalien, Braunschweig

[³²P]NAD⁺

spezifische Aktivität (800 Ci/mmol) Dupont-NEN, Bad Homburg

2.1.2. Materialien für molekularbiologische Arbeiten**2.1.2.1. Enzyme und Reaktionspuffer**

Alle verwendeten Restriktionsenzyme (Stammkonzentration 10 U/μl) mit den dazugehörigen Reaktionspuffern sind in der nachfolgenden Tabelle 2.1. zusammengefaßt. Sie wurden von der Firma MBI Fermentas, St. Leon-Rot bezogen.

Tabelle 2.1.: Übersicht der verwendeten Restriktionsenzyme und Reaktionspuffer

Restriktionsenzym	Reaktionspuffer
<i>Bam</i> HI	Y ⁺ -Tango™ -Puffer (33 mM Tris-Acetat, pH 7,9; 10 mM Mg-Acetat; 66 mM K-Acetat) mit 0,1 mg/ml BSA
<i>Eco</i> RI	Y ⁺ -Tango™ -Puffer mit 0,1 mg /ml BSA
<i>Hind</i> III	Puffer R (10 mM Tris-HCl, pH 8,5; 10 mM MgCl ₂ ; 100 mM KCl) mit 0,1 mg/ml BSA
<i>Kpn</i> I	Puffer B (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM MgCl ₂) mit 0,02 % Triton X-100 und 0,1 mg/ml BSA
<i>Xba</i> I	Y ⁺ -Tango™ -Puffer mit 0,1 mg/ml BSA
<i>Xho</i> I	Puffer R (siehe <i>Hind</i> III)

-*Taq* DNA-Polymerase (MBI-Fermentas, St. Leon-Rot; Stammkonzentration 1 U /μl)
 10 x *Taq*-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 8,8; 500 mM KCl; 0,08 % NP-40)
 25 mM MgCl₂-Stammlösung

-*Pfu* DNA-Polymerase (Promega, Heidelberg; Stammkonzentration 2,5 U/μl)

10x *Pfu*-Puffer (200 mM Tris-HCl pH 8,8; 20 mM MgSO₄; 100 mM KCl; 60 mM (NH₄)₂SO₄; 1 % Triton X-100; 100 μg/ml BSA (Nukleasefrei))

-T4-DNA-Ligase (Boehringer, Mannheim; Stammkonzentration 1 U/μl)

10x Ligase-Puffer (660 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM MgCl₂; 10 mM Dithioerythrit; 10 mM ATP)

-Alkalische Phosphatase (bovin, Stammkonzentration 1 U/μl), MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Alle Enzyme und die zugehörigen Puffer wurden bei -20 °C gelagert.

2.1.2.2. Primer und Nucleosid-Triphosphate

pcDNA3.1 SE:

5' -GACTCACTATAGGGAGACCC- 3'

GB1_ECO:

5' -GCGCGAATTCCACATGCTACTGGCGTTAG- 3'

GB3_ECO:

5' -GCGCGAATTCAGTTCCAGATTTTGAGGAAGC- 3'

GB3_BAM_TAG:

5' -GCGCGGATCCACCATGTACCCCTACGACGTGCCCCGACTACGCCGGGGAGATGGAGCAACTGCG- 3'

GB1-BAM_TAG:

5' -GCGCGGATCCACCATGTACCCCTACGACGTGCCCCGACTACGCCTCAGAGCTTGACCAGTTACGGC- 3'

Die Primer wurden von der Firma Life Technologies, Eggenstein in lyophilisierter Form bezogen. Die Primer-DNA wurde in 200 μl H₂O gelöst und aliquotiert bei -20 °C gelagert. Die Quantifizierung der Primer erfolgte spektralphotometrisch (siehe 2.2.1.3.).

dNTP-Mix

In 1 ml 10 mM wässriger Lösung sind je 10 μmole dATP, dGTP, dCTP und dTTP enthalten. Bezogen von MBI Fermentas, St. Leon-Rot. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.1.2.3. Verwendete Expressionsvektoren

Tabelle 2.2.: Übersicht der verwendeten Expressionsvektoren und der Inserts

Insert	Herkunft Sequenz	Vektor	Ligations- stellen	Quelle
Gβ1	bovin	pcDNA3.1	<i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI	Lohse ¹
Gβ3	human	pcDNA3.1	<i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI	eigenes Labor
Gβ3s	human	pcDNA3.1	<i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI	eigenes Labor
Gγ2	bovin	pcDNA3.1	<i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI	Lohse
Gγ5	bovin	pcDNA3.1	<i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI	Lohse
Gγ8c ²	bovin	pcDNA3.1	<i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI	eigenes Labor
Gγ12	bovin	pcDNA3.1	<i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI	eigenes Labor
HA-erk1	Ratte	pRc/CMV	<i>Xba</i> I / <i>Hind</i> III	Meloche ¹
HA-Gβ1	human	pcDNA3.1	<i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI	eigenes Labor
HA-Gβ3	human	pcDNA3.1	<i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI	eigenes Labor
HA-Gβ3s	human	pcDNA3.1	<i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI	eigenes Labor

¹Die entsprechende cDNA wurde uns freundlicherweise von M. Lohse und S. Meloche zur Verfügung gestellt.

²Gγ8c: Gγ8 aus Zapfen der Retina

In der nachfolgenden Abbildung 2.1. ist der für die Klonierungen verwendete pcDNA3.1.-Vektor (Invitrogen, Groningen, NL) dargestellt. Dieser Vektor ist geeignet für die Expression in eukaryotischen Zellen. Gezeigt werden außerdem die Klonierungsstellen mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen, in die die Fremd-DNA inseriert werden kann.

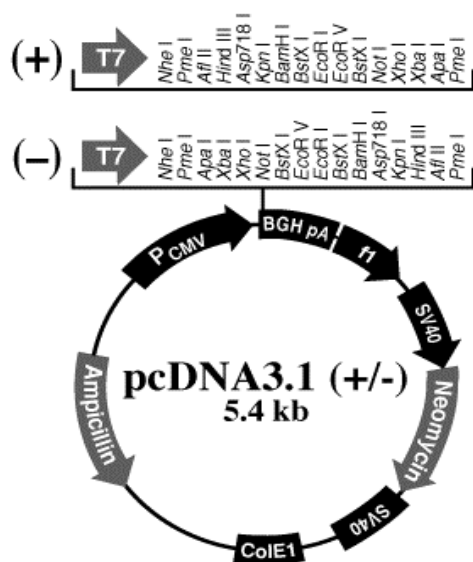


Abb. 2.1. : pcDNA3.1 Expressionsvektor

2.1.3. Verbrauchsmaterialien

Bicinchoninic Acid („BCA“) Protein Assay Reagent Kit
 Chromatographie Papier P 81
 Zellulosenitrat Nucleinsäuren- und Proteintransfer-
 medium BA 85; 0,45 µm Porengröße

Pierce, Rockford, USA
 Whatman, Maidstone, England
 Schleicher & Schuell, Daßel

Enhanced Chemiluminescence Reagent („ECL”)	Amersham, Buckinghamshire, GB
Kodak X-Omat Filme	Kodak, Rochester, USA
Polypropylen-Röhrchen (50 ml, 14 ml)	Greiner, Nürtingen
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Sterilfilter (Porengröße 0,22 µm)	Millipore, Bedford, USA
Zellkulturschalen (verschiedene Abmessungen)	Greiner, Nürtingen

2.1.4. Geräte

Casy 1 Zellzählgerät	Schärfe Systems, Reutlingen
Fluoreszenzmeßgerät LS 50B	Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA
Minigel-Elektrophoresekammer	Life Technologies, Eggenstein
PhosphoImager (Storm 860 PC)	Molecular Dynamics, Krefeld
Spektralphotometer	Pharmacia, Freiburg
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Trans-Blot Elektrotransferkammer	Bio-Rad, München
Vertikalelektrophoresekammer (Serie SE 600)	Hoefer, Vertrieb: Serva, Heidelberg

2.1.5. Puffer, Lösungen und Medien

2.1.5.1. Häufig verwendete Lösungen

Phosphatgepufferte Salzlösung nach Dulbecco (PBS)

NaCl	137	mM
KCl	2,7	mM
Na ₂ HPO ₄	4,3	mM
KH ₂ PO ₄	1,4	mM

2.1.5.2. Protease- und Tyrosinphosphatase-Inhibitoren

Aprotinin-Stammlösung

14 mg Aprotinin gelöst in 5 ml steriler 0,9 % (v/v) NaCl-Lösung, Lagerung bei -20 °C

Leupeptin-Stammlösung

Leupeptin 10 mg/ml in H₂O, Lagerung bei -20 °C

Pepstatin A-Stammlösung

Pepstatin 1 mg/ml in Methanol, Lagerung bei -20 °C

PMSF-Stammlösung

200 mM PMSF in Isopropanol, Lagerung bei 4 °C

Natriumorthovanadat-Stammlösung (Na₃VO₄)

Es wurde eine 200 mM Na₃VO₄-Lösung in H₂O hergestellt. Die Lösung wurde mit konzentrierter HCl auf pH 9 - 10 eingestellt, dabei kam es zum Farbumschlag nach gelb. Bis zur vollständigen Entfärbung der Lösung wurde diese bei 95 °C erhitzt. Der pH-Wert wurde nach

dem Abkühlen erneut auf 9 - 10 titriert. Die genaue Konzentration der Lösung wurde photometrisch ermittelt. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ beträgt bei $\lambda = 265 \text{ nm}$ $2925 \text{ l/mol} \times \text{cm}$. Die Lösung wurde bei -20°C gelagert.

2.1.5.3. Lösungen für die Molekularbiologie

Lösungen für die Bakterienkultur

Die Antibiotika wurden von Sigma, Deisenhofen bezogen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C . Ampicillin (Stammkonzentration $50 \text{ mg/ml H}_2\text{O}$), Gebrauchskonzentration $100 \mu\text{g/ml}$
Kanamycin (Stammkonzentration $10 \text{ mg/ml H}_2\text{O}$), Gebrauchskonzentration $50 \mu\text{g/ml}$

Luria Bertani (LB-) Medium wurde als Pulvermedium von der Firma Life Technologies, Eggenstein bezogen. 20 g wurden in $1 \text{ l H}_2\text{O}$ gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlen auf unter 50°C wurden die entsprechenden Antibiotika zugesetzt.

Wurden Petrischalen mit LB-Medium und Ampicillin hergestellt, so wurden 15 g Agar auf 1 l LB-Medium zugegeben und autoklaviert. Nach Abkühlen auf unter 50°C wurde Ampicillin (Endkonzentration $100 \mu\text{g/ml}$) zugefügt und die Petrischalen (85 mm) mit $\sim 30 \text{ ml}$ LB-Medium gefüllt. Nach Erhärten des LB-Mediums konnten die Petrischalen bei 4°C gelagert werden.

Lösungen für die Reinigung von DNA

Die Reinigung von DNA erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen, Hilden. Die dazugehörigen Puffer wurden gebrauchsfertig mitgeliefert.

Lösungen für DNA-Präparationen

Die entsprechenden Puffer wurden gebrauchsfertig von der Firma Qiagen, Hilden bezogen.

Lösungen für Agarosegelelektrophorese

5 x TBE-Puffer:

Tris	445	mM
Borsäure	445	mM
EDTA	10	mM; pH 7,5 - 8,0
Zugabe Ethidiumbromid (Endkonzentration $0,5 \mu\text{g/ml}$)		

DNA-Auftragspuffer:

Bromphenolblau	0,25	% (w/v)
Xylene Cyanol	0,25	% (w/v)
Ficoll	25	% (w/v)

2.1.5.4. Medien und Seren für die Zellkultur

Dulbecco's modified Eagles Medium (DMEM, Flüssigmedium), Modified Eagles Medium (MEM, Flüssigmedium, thymidinfrei), Fötale Kälberserum (FBS), Antibiotika-Stamm-lösung (1000 U/ml Penicillin, $1 \mu\text{g/ml}$ Streptomycin) und $1 \times$ Trypsin-EDTA-Lösung wurden von der Firma Sigma, Deisenhofen bezogen. Poly-L-Lysin von Biochrom KG Seromed, Berlin.

2.1.5.5. Lösungen für die Präparation von Zelllysaten

Radio-Immuno-Precipitation-Buffer (RIPA-Puffer)

Tris / HCl; pH 7,4	50	mM
NaCl	150	mM
NP-40	1	% (v/v)
NaF	1	mM
Na-Desoxycholat	0,25	% (w/v)
EGTA	1	mM
PMSF	1	mM
Na ₃ VO ₄	1	mM
Leupeptin	1	µg / ml
Aprotinin	1	µg / ml
Pepstatin A	1	µg / ml

Der RIPA-Puffer wurde aliquotiert und bis zu seiner Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Die Inhibitoren Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin A, Natriumorthovanadat und PMSF wurden jeweils vor Versuchsbeginn frisch zugegeben.

2.1.5.6. Lösungen für die Präparation von Zellmembranen

Zellmembran-Lysepuffer

Tris / HCl; pH 7,5	20	mM
Saccharose	250	mM
MgCl ₂	1,5	mM
ATP	1	mM
Benzamidin	3	mM
PMSF	1	mM
Trypsininhibitor aus Sojabohne	2	µg/ml

Zellmembran-Waschpuffer

Tris / HCl; pH 7,5	20	mM
EDTA	1	mM
DTT	1	mM
Benzamidin	3	mM
PMSF	1	mM
Trypsininhibitor aus Sojabohne	2	µg/ml

ATP, DTT, Benzamidin, PMSF und Trypsininhibitor aus Sojabohne wurden erst kurz vor Versuchsbeginn zugegeben. Die Puffer wurden bei 4 °C gelagert.

2.1.5.7. Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese und den Elektrottransfer

SDS-Stammlösung:

10 % (w/v) in H₂O

Probenpuffer nach Laemmli (3 fach):

SDS 20%	3	ml
Glyzerol	3	ml
Tris 1M, pH 6,8	1,8	ml
H ₂ O	2,2	ml
β-Mercaptoethanol 14,4 M	300	µl
Bromphenolblau	2	mg

Wurden Proteine < 20 kDa aufgetrennt, so wurde statt Bromphenolblau 2 mg m-Kresol zugesetzt. Der Probenpuffer wurde bei -20 °C gelagert.

APS-Stammlösung: 10 % (w/v) in H₂O

Trenngelpuffer (8-fach konzentriert):

Tris / HCl; pH 8,8 3 M

Sammelgelpuffer:

Tris / HCl; pH 6,8 0,5 M

Elektrophoresepuffer (10-fach konzentriert):

Kathodenpuffer: Tris / HCl; pH 8,3 250 mM
(Laufpuffer) Glyzin 1,92 M
SDS 1 % (w/v)

Anodenpuffer: Tris 250 mM
Glyzin 1,92 M
Natriumacetat 1 M

SDS-PAGE-Gelmischungen:

Der nachfolgende Ansatz ist ausreichend für zwei Gradientengele (je 18 cm x 18 cm)

Verschlußgel:

Trenngelpuffer 3 ml
Acrylamid 40 % (29:1) 3 ml
APS 10 % 30 µl
TEMED 30 µl

Trenngel 8 %:

Acrylamid 40 % (29:1) 4 ml
Trenngelpuffer 2,5 ml
H₂O 13,2 ml
SDS 10 % 200 µl
APS 10 % 70 µl
TEMED 7 µl

Trenngel 20 %:

Acrylamid 40 % (29:1) 10 ml
Trenngelpuffer 2,5 ml
H₂O 7,2 ml
Saccharose 3 g
SDS 10 % 200 µl
APS 10 % 70 µl
TEMED 7 µl

Sammelgel 5 %:

Acrylamid 40 % (29:1) 2,55 ml
Sammelgelpuffer 2,5 ml
H₂O 14,55 ml
SDS 10 % 200 µl
APS 10 % 200 µl
TEMED 20 µl

Transferpuffer (Elektrotransfer):

Tris	25	mM
Glyzin	192	mM
Methanol, technisch	20	% (v/v)

Ponceau S-Stammlösung:

Ponceau S	2	% (w/v)
TCA	30	% (w/v)
Sulfosalizylsäure	30	% (w/v)

Ponceau S-Gebrauchslösung:

Stammlösung 1:10 mit H₂O verdünnen

Die hier genannten Lösungen wurden, wenn nicht anders angemerkt, bei 4 °C gelagert.

2.1.5.8. Lösungen für den immunologischen Nachweis von Proteinen im WesternblotTBS („Tris-buffered Saline“)

Tris / HCl; pH 7,4	20	mM
NaCl	100	mM

TTBS („Tween 20/TBS“)

Tween 20	0,05	% (v/v) in TBS
----------	------	----------------

Antikörperverdünnungslösung

Albumin (Fraktion V, bovin)	1	% (w/v) in TTBS
-----------------------------	---	-----------------

Blockierlösung

Milchpulver, fettfrei	5	% (w/v) in TTBS
-----------------------	---	-----------------

2.1.5.9. Lösungen für die Messung der intrazellulären Ca²⁺-KonzentrationNa-HEPES-Meßpuffer; pH 7,56

NaCl	135	mM
CaCl ₂	1	mM
MgCl ₂	1	mM
KCl	5	mM
HEPES	20	mM
Glukose	10	mM

Digitonin-Lösung (6 ml)

Methanol (p.a.)	33	% (v/v)
DMSO	67	% (v/v)
Digitonin	21,6	mg

Tris/ EGTA-Lösung; pH 8,4

EGTA	0,4	M
Tris	3	M

2.1.5.10. Lösungen für die PTX katalysierte *in vitro* ADP-Ribosylierung

Stammlösungen:

Tris / HCL; pH 8	1	M
EDTA	100	mM
DTT	200	mM
GDP	10	mM
NAD	10	mM
ATP	10	mM
SDS	2,5	% (w/v)
BSA	1	mg/ml
PTX	100	µg/ml

ATP-, NAD- und DTT- Stammlösungen wurden frisch vor Versuchsbeginn angesetzt und ebenso wie PTX- und BSA-Lösungen bei 4 °C aufbewahrt. Die GDP-Stammlösung wurde in Aliquots bei -20 °C gelagert.

Reaktionspuffer:

Tris / HCl; pH 8	25	mM
EDTA	1	mM
DTT	10	mM
ATP	1	mM
GDP	100	µM

Der Reaktionspuffer wurde am Versuchstag frisch aus den entsprechenden Stammlösungen angesetzt und auf Eis gekühlt. Sollte mit diesem Reaktionspuffer die [³²P]-NAD⁺-Stammlösung verdünnt werden, dann wurde dem Reaktionspuffer zusätzlich NAD (Endkonzentration 100 nM) zugesetzt.

[³²P]NAD⁺-Stammlösung 5 mCi/ml

[³²P]NAD⁺-Gebrauchslösung : Stammlösung 1:5 mit Reaktionspuffer verdünnen. Lagerung bei -20 °C.

2.1.5.11. Lösungen für die Messung der MAP-Kinase-Aktivität

MAP-Kinase-Lysepuffer:

Tris / HCl; pH 8	50	mM
NaCl	150	mM
EDTA	5	mM
NP-40	1	% (v/v)
Na-Desoxycholat	0,5	% (w/v)
SDS	0,1	% (w/v)
NaF	10	mM
Na-Pyrophosphat	10	mM
PMSF	0,1	mM

PMSF wurde frisch vor Versuchsbeginn zugegeben, der Puffer wurde bei -20 °C gelagert.

Kinasepuffer:

HEPES; pH 7,4	20	mM
MgCl ₂	10	mM
DTT	1	mM

Der Puffer wurde frisch vor der Messung angesetzt und bei 4 °C gekühlt.

2.2. Methoden

2.2.1. Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Reinigung von DNA

DNA-Fragmente (100 bp - 10 kb), die mittels PCR amplifiziert wurden, mußten zunächst von Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen gereinigt werden. Die Reinigung wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit durchgeführt. Das Prinzip der Reinigung beruht dabei auf den selektiven Bindungseigenschaften von DNA an die Silikagel-Membranen der Säulen. Alle notwendigen Puffer und Säulen (Bindungskapazität 10 µg DNA) wurden von der Firma Qiagen, Hilden mitgeliefert. Die gereinigte DNA wurde dann bei -20 °C gelagert.

2.2.1.2. Präparation von Plasmid-DNA

Die für Transfektionen benötigte Plasmid-DNA, die in entsprechend transformierten Bakterien enthalten war, mußte zunächst vermehrt und anschließend aus den Bakterien präpariert werden. Hierzu wurde ein Bakterienklon, der die gewünschte Plasmid-DNA enthielt in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft und 8 h lang bei 37 °C unter konstantem Schütteln (200 rpm) inkubiert. Anschließend wurde diese Starterkultur in LB-Medium mit Antibiotikum weiter im Verhältnis 1:500 verdünnt und weitere 16 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Zur Gewinnung der Plasmid-DNA aus den Bakterien wurde nun eine Präparation mit dem QIAfilter Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen, Hilden durchgeführt. Das Prinzip der Präparation besteht in einer alkalischen Lyse der Bakterien, gefolgt von Bindung der Plasmid-DNA an Anionenaustauscher-Säulen.

Abschließend erfolgte eine Konzentrationsbestimmung der erhaltenen DNA, die bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert wurde. Außerdem wurde die Qualität der Plasmidpräparation nach Linearisierung der DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen im Agarosegel kontrolliert.

2.2.1.3. Quantifizierung von DNA im Spektralphotometer

Konzentration und Reinheitsgrad der präparierten Plasmid-DNA wurden durch Spektralphotometrie bei $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm abgeschätzt. Für doppelsträngige DNA wird eine Konzentration von 50 µg/ml bei einer optischen Dichte (OD) von 1 angenommen. Die

Reinheit der DNA-Präparation ergibt sich aus dem Quotienten der optischen Dichte bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ und $\lambda = 280 \text{ nm}$ ($\text{OD } 260 / \text{OD } 280$). Theoretisch sollte dieser Wert bei 2 liegen. Wir haben ausschließlich DNA verwendet, bei der sich mindestens ein Quotient von 1,5 bestimmen ließ.

Zur Quantifizierung der Oligonukleotidprimer wurde zunächst die OD für 5 μl der rekonstituierten Primerlösung (200 μl) bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ bestimmt. Weiter wurde berechnet:

$$x \text{ nmole}/\mu\text{l} = \text{OD}260 \times \text{nmole pro OD} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die Angabe nmole pro OD konnte dem technischen Datenblatt des Herstellers entnommen werden. Alle Primer wurden schließlich auf eine Konzentration von 10 pmole/ μl eingestellt.

2.2.1.4. Restriktion von Plasmid-DNA

Mit Hilfe entsprechender Restriktionsendonukleasen läßt sich aus der Plasmid-DNA das enthaltene DNA-Fragment (Insert) herausschneiden und nach Gelelektrophorese auf seine korrekte Größe hin überprüfen.

Jeweils 1 μg der entsprechenden Plasmid-DNA wurde in 20 μl Reaktionspuffer verdünnt und mit etwa 10 U des entsprechenden Restriktionsenzym bei 37 °C (bei den hier verwendeten Enzymen, siehe Tabelle 2.1.) 1 h lang inkubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 6 μl Auftragspuffer beendet und die so gewonnenen DNA-Fragmente im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.1.5. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

In der Regel wurde die Gelelektrophorese in 1,5 %igen Agarosegelen durchgeführt. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 0,5 x TBE Puffer aufgenommen und durch Erhitzen in der Mikrowelle geschmolzen. Nach Abkühlen auf ungefähr 50 °C wurde Etidiumbromid (Endkonzentration 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) untergemischt und die flüssige Agarose in die Gelkammer mit einem entsprechenden Probenkamm gegossen. Nach Aushärten des Gels wurde der Probenkamm entfernt und das Gel in die mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Schließlich wurden die Proben und der Marker aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 80 - 120 V durchgeführt. Nach ungefähr 1 h hatte die Farbstofffront eine Strecke von 2/3 der Gelgröße zurückgelegt. Die DNA-Fragmente konnten dann unter UV-Licht durch Vergleich ihrer Größe mit dem Marker beurteilt werden. Als Größenstandards wurden der pBR322 DNA / *Alu* I-Marker, 20 (Fragmentgrößen 908 bp - 11 bp) und der

pBR322 DNA / *Alw* 44I / *Mva* I-Marker, 21 (Fragmentgrößen 2617 bp - 13 bp) der Firma MBI Fermentas, St. Leon-Rot verwendet.

2.2.2. Epitop-Markierungen

Um mögliche Interaktionen von G β -Proteinen und dem PDGF-Rezeptor zu untersuchen, wurden bestimmte G β -Untereinheiten mit einer N-terminalen HA-Epitop-Markierung versehen. Epitop-Markierung ist eine Methode zur Analyse und Reinigung von Proteinen. Dabei wird dem zu untersuchenden Protein ein kurzes Peptid-Epitop, das das Protein normalerweise nicht besitzt, angefügt. Das markierte Protein läßt sich dann durch einen Epitop-spezifischen Antikörper nachweisen. Es gibt eine Reihe von Epitopen, die als Markierung verwendet werden:

Tabelle 2.3.: Beispiele für Epitop-Markierungen

Markierung	Sequenz
HA	Peptid vom humanen Influenza Hämagglutinin Protein YPYDVPDYA
Flag	synthetisches Peptid DYKDDDDK
His ₆ -His ₁₀	Polyhistidine

Diese Epitop-Sequenzen können über verschiedene rekombinante DNA-Techniken an die DNA-Sequenz des betreffenden Proteins angefügt werden. Prinzipiell kann dies N- oder C-terminal, aber auch innerhalb der kodierenden Sequenz des Proteins geschehen.

2.2.2.1. PCR-Mutagenese

Die cDNA-Sequenzen von G β 3, G β 3s und G β 1 lagen ligiert im Expressionsvektor pcDNA3.1 vor. Zunächst wurde über PCR-Mutagenese mit modifizierten Primern diesen DNA-Sequenzen ein N-terminales HA-Epitop angefügt. Dabei wurde berücksichtigt, daß die für die spätere Einklonierung in den Zielvektor pcDNA3.1 notwendigen *Bam* HI- und *Eco* RI-Schnittstellen enthalten waren. Als Antisense(AS)-Primer wurden GB3_ECO bzw. GB1_ECO mit darin enthaltenen *Eco* RI-Sequenzen verwendet (siehe 2.1.2.2.). Als Sense(SE)-Primer wurden GB3_BAMTAG bzw. GB1_BAMTAG eingesetzt. Diese Primer besitzen im 5'-Bereich eine HA-Sequenz (5' -TAC-CCC-TAC-GAC-GTG-CCC-GAC-TAC-GCC- 3'), deren Basentriplets für Mammalierzellen optimiert ist. Die Primer-Sequenz beginnt mit einer kurzen GCGC-Sequenz am 5'-Ende, damit eine optimale Restriktion möglich

ist. Außerdem besitzt der Primer eine Kozak-Sequenz (5' -CCACCATG- 3'). Diese Konsensussequenz dient einer effizienteren Translation in eukaryotischen Zellen. Schließlich ist eine *Bam* HI-Restriktionsstelle (5'-G!GATCC-3') vorhanden. Der GB3_BAMTAG-Primer hybridisiert über einen Bereich von 20 bp mit der Gβ3-Sequenz; der GB1_BAMTAG-Primer hybridisiert über 21 bp mit der Gβ1-Sequenz. Die jeweiligen Gβ-DNA-Sequenzen wurden mit den entsprechenden Primern mittels PCR amplifiziert.

PCR-Reaktion (50 µl Endvolumen):

DNA (Gβ1, Gβ3, oder Gβ3s in pcDNA3.1)	500	ng
10 x <i>Pfu</i> Puffer	1	x
SE-Primer	20	pmole
AS-Primer	20	pmole
dNTP's	200	µM
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	2,5	U
mit H ₂ O auf 50 µl Endvolumen einstellen		

Alle Komponenten wurden auf Eis pipettiert. Um die DNA-Sequenzen möglichst fehlerfrei zu amplifizieren, wurde eine *Pfu*-DNA-Polymerase, die eine Korrekturlesefunktion zur Minimierung falsch eingebauter Nukleotide besitzt, verwendet. Aufgrund der 3'-Exonuklease-Aktivität der *Pfu*-DNA-Polymerase, die zu einem Abbau der Primer führen würde, wurde das Enzym zuletzt zum Reaktionsansatz zugegeben. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße sofort in den auf 95 °C vorgewärmten Thermocycler gestellt. Die initiale Denaturierung der DNA erfolgte 1 min lang bei 95 °C, darauf folgte ein weiterer 1-minütiger Denaturierungsschritt bei 94 °C. Zur Hybridisierung der Primer wurde die Temperatur 45 sec lang auf 58 °C gesenkt. Die durch die *Pfu*-DNA-Polymerase katalysierte DNA-Synthese wurde bei 72 °C 4min lang durchgeführt. Diese Schritte wurden, beginnend mit der 1-minütigen Denaturierung bei 94 °C, noch 34 x wiederholt. Die abschließende DNA-Verlängerung erfolgte nach dem letzten PCR-Zyklus 10 min lang. Nach Abkühlen des Thermocyclers auf 8 °C wurden die Proben entnommen und die amplifizierte HA-markierte Gβ-DNA (PCR-Produkt) gereinigt um Enzyme, Proteine und Primer abzutrennen. Die Reinigung erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen, Hilden (siehe 2.2.1.1.).

Da die PCR-Produkte schließlich in den pcDNA3.1-Vektor über kohäsive Enden ligiert werden sollten, war es zunächst notwendig, die überhängenden einzelsträngigen DNA-Enden durch Restriktion (siehe 2.2.1.4.) der PCR-Produkte zu erzeugen.

Hierzu wurde das gesamte Eluat (30 µl) mit den Restriktionsenzymen *Bam* HI und *Eco* RI geschnitten (1 h, 37 °C). Anschließend erfolgte eine erneute Reinigung, um die Restriktionsenzyme zu entfernen. Die DNA wurde schließlich in je 30µl Elutions-Puffer (vom Hersteller)

aufgenommen. Zur Kontrolle der Reinigung und zur Abschätzung der DNA-Menge für die Ligation wurde jeweils 10 µl Probe in einem 1,5 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die übrigen Proben wurden bis zur Ligation bei -20 °C verwahrt.

2.2.2.2. Vorbehandlung des Zielvektors pcDNA3.1

Um beim Zielvektor pcDNA3.1 ebenfalls die entsprechenden kohäsiven Enden für die Ligation zu erzeugen, wurde der Vektor (10 µg) auch mit den Restriktionsenzymen *Bam* HI und *Eco* RI geschnitten. Dabei ist die Effizienz dieser Restriktion für die Effektivität der späteren Einklonierung des Inserts (PCR-Produkt) von entscheidender Bedeutung. Nicht linearisierter Vektor kann kein Insert aufnehmen, ergibt aber nach der Transformation aufgrund des Ampicillinresistenz-Gens des Vektors einen positiven Bakterienklon (siehe 2.2.2.4.).

Der Restriktionsansatz wurde 1 h lang bei 37 °C inkubiert. Um die Vollständigkeit der Restriktion zu kontrollieren, wurde 1 µl des Ansatzes in einem 1,5 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die übrige Probe wurde bei 37 °C weiter inkubiert. Nach erfolgter Restriktion wurde der Vektor mit Alkalischer Phosphatase (AP) dephosphoryliert. Dies verhindert eine Religierung des Vektors.

Für eine einfache Restriktion gilt, daß bei 2 µg eines 5 kb großen Vektors 1,4 pmole offene Enden vorliegen. Da hier eine Restriktion mit zwei Restriktionsenzymen durchgeführt wurde, entsprechen 10 µg Vektor 14 pmole offener Enden. Es wurden 1 U AP / pmole offene Enden eingesetzt, also hier entsprechend 14 U AP. Nach Zugabe der AP wurde der Restriktionsansatz für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Durch Reinigung (siehe 2.2.1.1.) über Silikagel-Säulen wurden die Restriktionsenzyme entfernt.

Zur Abschätzung der DNA-Menge für die folgende Ligation wurde ein Aliquot (5 µl) gereinigter Vektor elektrophoretisch in einem 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt.

2.2.2.3. Ligation

Um eine optimale Ausbeute von rekombinanten Plasmidklonen nach Ligation und Transformation zu erhalten, ist es notwendig, daß im Ligationsansatz im Falle von kohäsiven Enden ein molares Verhältnis von etwa 5:1 zwischen Insert (in diesem Fall ~1000 bp) und Vektor (~5,4 kb) vorliegt. Die Mengen an Vektor und Insert wurden nach Agarosegelelektrophorese abgeschätzt, und es wurden ca. 100 ng pcDNA3.1 Vektor und 500 ng Insert verwendet.

Ligationsansatz (Endvolumen 30 µl):

Vektor (pcDNA3.1)	100	ng
Insert (Ha-markierte Gβ-DNA)	500	ng
10 x Ligase-Puffer	1	x
T4-DNA-Ligase	3	Weiss U
mit H ₂ O auf Endvolumen einstellen		

Der Reaktionsansatz wurde pipettiert und 5 h lang bei 18 °C inkubiert. Anschließend wurde die T4-Ligase durch exakt 5-minütige Inkubation der Proben bei 70 °C inaktiviert. Von jedem Ligationsansatz wurden 10 µl bei der nachfolgenden Transformation eingesetzt, der Rest des Ansatzes wurde für eine ggf. notwendige zweite Transformation bei 4 °C gelagert.

2.2.2.4. Bakterien-Transformation

Unter Transformation versteht man die Einschleusung von (Vektor-) DNA in entsprechend vorbehandelte aufnahmefähige („kompetente“) Zellen. Hierzu wurden bereits kompetente *E. coli* JM 109-Zellen der Firma Promega, Heidelberg verwendet.

Zunächst wurden Reaktionsgefäße auf Eis vorgekühlt und die kompetenten Zellen vorsichtig und langsam auf Eis aufgetaut. Je Reaktionsgefäß wurden 20 µl kompetente Zellen und 10 µl Ligationsansatz steril pipettiert und vorsichtig gemischt. Es folgte eine 30 min lange Inkubation auf Eis. In dieser Zeit sollte die Fremd-DNA von den Bakterien aufgenommen werden können. Anschließend erfolgte eine Hitzeschock-Behandlung der Zellen bei 42 °C, die genau 40 sec lang dauern soll. Hierdurch wurde eine weitere Aufnahme von Fremd-DNA durch die Zellen gestoppt. Dies ist ein kritischer Schritt, da eine längere Inkubation bei dieser Temperatur die Bakterien schädigen kann.

Die Zellen wurden dann sofort wieder auf Eis gestellt und 2 min lang inkubiert. Es wurden dann bei RT zu jedem Ansatz 80 µl SOC-Medium (Life Technologies, Eggenstein) steril zupipettiert und die Ansätze bei 37 °C 1 h lang unter leichtem Schütteln inkubiert. Im SOC-Medium sollen die Zellen die Ampicillinresistenz, die der pcDNA3.1-Vektor besitzt, exprimieren können. Diese dient später zur Selektion der Bakterien. Danach war die Bakterientransformation abgeschlossen. Die Ansätze (25 - 40 µl) wurden schließlich jeweils auf einer LB / Ampicillin-Petrischale steril ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Sicherheit wurden die restlichen Ansätze bei 4 °C verwahrt und konnten, falls erforderlich, erneut ausgestrichen werden.

2.2.2.5. Klon-PCR

Zur Identifizierung von positiven Bakterienklonen (mit Vektor und Insert) wurde eine Klon-PCR durchgeführt. Die Selektion aufgrund der Ampicillinresistenz führte dazu, daß Bakterien ohne Vektor nicht wachsen konnten. Es konnten aber sowohl Bakterienklone mit leerem Vektor (ohne Insert), als auch Klone mit Vektor und Insert wachsen. Daher war es notwendig, die positiven Bakterienklone mittels PCR unter Verwendung von geeigneten Primern zu identifizieren. Die PCR-Produkte konnten dann nach gelelektrophoretischer Auftrennung aufgrund ihrer Größe identifiziert werden.

Von den entsprechenden LB-Ampicillin-Petrischalen wurden unter sterilen Bedingungen jeweils 5 - 10 Klone abgenommen und direkt zum PCR-Ansatz gegeben.

PCR-Reaktion (Endvolumen 50 µl):

10 x <i>Taq</i> -Puffer	1	x
MgCl ₂	1,5	mM
<i>Taq</i> -Polymerase	1	U
dNTP's	200	µM
AS*-Primer	20	pmole
SE*-Primer	20	pmole
mit H ₂ O auf Endvolumen einstellen		

AS*-Primer für Bakterienklone mit HA-markierten Gβ1: GB1_ECO; für HA-markierte Gβ3, und -Gβ3s: GB3_ECO; SE*-Primer für alle Klone: pcDNA3.1 SE

Alle Komponenten wurden auf Eis pipettiert und die Reaktionsgefäße in einen auf 95 °C vorgewärmten Thermocycler gestellt. Die initiale Denaturierung der DNA erfolgte 4 min lang bei 95 °C. Hierbei sollten auch die Bakterien aufgeschlossen werden. Anschließend folgte ein weiterer 1-minütiger Denaturierungsschritt bei 94 °C. Zur Primer-Hybridisierung wurde die Temperatur 45 sec lang auf 58 °C gesenkt. Die durch *Taq*-Polymerase katalysierte DNA-Verlängerung wurde 1 min lang bei 72 °C durchgeführt. Anschließend wurde dieser Zyklus, beginnend mit der 1-minütigen Denaturierung bei 94 °C, noch 35 x wiederholt. Die abschließende Kettenverlängerung erfolgte 10 min lang bei 72 °C. Von jeder Probe wurde ein Aliquot (5 µl) in einem 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt. Durch Vergleich der Größe der PCR-Produkte mit den Größenstandards konnten positive Bakterienklone identifiziert werden. In Abbildung 2.2. ist das Resultat einer solchen Klon-PCR im Agarosegel dargestellt.

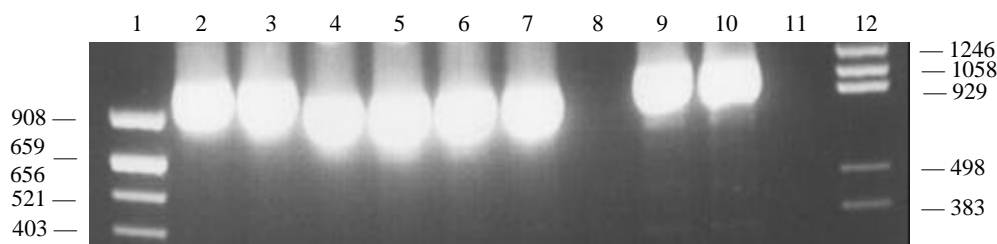


Abb. 2.2.: HA-markierte G β -DNA nach Klon-PCR

Dargestellt ist die HA-markierte G β -DNA aus der Klon-PCR nach elektrophoretischer Auftrennung im 1,5 %igen Agarosegel. HA-G β 3 (Spur 2, 3), HA-G β 3s (4-7), HA-G β 1 (Spur 9, 10), Negativkontrolle (Ansatz ohne DNA, Spur 8, 11); Größenstandards pBR322 DNA / *AluI* (Spur 1) und pBR322 DNA / *Alw441* / *MvaI* (Spur 12) in bp.

Parallel zur Klon-PCR wurde von denselben Klonen jeweils ein Röhrchen mit 5 ml LB-Ampicillin-Medium (Starterkultur) angeimpft. Diese wurden anschließend bei 37 °C unter Schütteln über Nacht inkubiert. Von den als positiv identifizierten Bakterienklonen wurden dann je 200 μ l der Starterkulturen in 100 ml LB-Ampicillin-Medium gegeben und erneut 16 h lang bei 37 °C inkubiert. Aus diesen Kulturen wurde schließlich die Plasmid-DNA (siehe 2.2.1.2.) präpariert. Die so gewonnene DNA wurde in einer DNA-Sequenzierung geprüft.

Die Expression der HA-G β -Proteine wurde nach Transfektion von HEK-293tsa- bzw. CHOwt-Zellen und Präparation von Ganzzelllysaten im Immunoblot überprüft.

2.2.3. Zellkultur

Die Kultivierung der verschiedenen Zelllinien erfolgte stets unter Beachtung der üblichen Steriltechnik in einer Reinluftwerkbank. Bei allen aufgeführten Zelllinien handelt es sich um adhärent wachsende Zellen.

Humane Hautfibroblasten:

Aus Stanzbiopsien der Haut gesunder Probanden wurden Fibroblasten in Primärkultur gewonnen und weiter passagiert.

CHOwt-Zellen:

Fibroblastäre Zellen, die aus Ovarien des chinesischen Hamsters gewonnen wurden. Diese Zelllinie ist stabil mit PDGF- β -Rezeptor transfiziert. Sie wurde uns freundlicherweise von Dr. L.T. Lewis (San Francisco) zur Verfügung gestellt.

Mausfibroblasten (NIH3T3):

Hierbei handelt es sich um eine aus embryonalem Mausgewebe kultivierte permanente Fibroblastenzelllinie, die durch eine spezielle Aussaattechnik (Splitten alle 3 Tage in einer Dichte von 1:10³; „3T3“) immortalisiert wurde.

COS-7-Zellen:

Fibroblastäre Zellen, die aus der Niere der grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) stammen und mit dem SV40 Virus immortalisiert wurden. Diese Zellen exprimieren das SV40 large T-Antigen und eignen sich besonders gut für die Transfektion mit Plasmiden, die einen SV40-Replikationsstartpunkt besitzen und somit diese Expressionsplasmide stark amplifizieren können.

HEK-293tsa-Zellen:

Hierbei handelt es sich um humane embryonale Nierenzellen der Linie 293, die fibroblastäre Eigenschaften besitzen. Diese Zellen sind stabil mit dem SV40 large T-Antigen transfiziert worden. Somit können auch diese Zellen Expressionsplasmide mit dem SV40-Replikationsstartpunkt stark amplifizieren.

Alle Zellen wurden in einem CO₂-Inkubator bei 37 °C in einer Atmosphäre aus 95 % wasser-gesättigter Raumluft und 5 % CO₂ kultiviert. Als „Wachstumsmedium“ wurde DME-Medium, supplementiert mit 10 % (v/v) FBS, 100 U/ml Penicillin und 0,1 µg/ml Streptomycin, verwendet. Die Zellen wurden zweimal pro Woche im Verhältnis 1:3 bis 1:5 passagiert. Dazu wurde das alte Medium abgenommen und die Zellen mit 1x Trypsin-EDTA-Lösung von der Kulturschale abgelöst. Frisches Medium wurde zugegeben und schließlich wurden die Zellen 8 min lang bei 84 x g pelletiert. Diese Zellen wurden dann in frischem Wachstumsmedium resuspendiert und auf Zellkulturschalen verteilt.

Sollten die Zellen transfiziert werden, so war für eine möglichst hohe Transfektionseffizienz ein definierter Konfluenzgrad der Zellen erforderlich, der für jeden Zelltyp und jede Transfektionsmethode bestimmt werden mußte.

Hierzu wurden die Zellen zunächst trypsiniert und pelletiert. Die pelletierten Zellen wurden in einem kleinen Volumen Medium resuspendiert und die Zellzahl mit einem Casy-Zellzählgerät bestimmt. Anschließend wurden die Zellen mit Wachstumsmedium auf eine bestimmte Zellzahl eingestellt und auf Kulturschalen ausgesät (siehe Tabelle 2.4.).

2.2.4. Transiente Transfektion

Bei dieser Art der Transfektion werden Expressionsvektoren, die Fremd-DNA tragen, in eukaryotische Wirtszelllinien eingeschleust und die entsprechenden Proteine vorübergehend in diesen Zellen überexprimiert. Die Proteine können dann in anschließenden Untersuchungen charakterisiert werden, beispielsweise, indem ihr Einfluß auf bestimmte Effektorsysteme in der Zelle analysiert wird.

Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen aus logarithmisch wachsenden Kulturen in frischem Wachstumsmedium auf 35 mm Kulturschalen so ausgesät, daß sie am Transfektionstag einen Konfluenzgrad von 50 - 60 % erreicht hatten (siehe Tabelle 2.4.).

Im Falle der Transfektion von HEK-293tsa-Zellen war eine Vorbehandlung der Kulturschalen mit Poly-L-Lysin erforderlich, um die dauerhafte Anhaftung dieses Zelltyps für die Experimente zu gewährleisten. Hierzu wurden die Zellkulturschalen 20 min lang mit 1 ml einer 12,5 %igen Poly-L-Lysin Lösung inkubiert. Diese wurde anschließend abgenommen und die Zellen ausgesät.

Tabelle 2.4.:	Zelllinie	Zellzahl¹	Konfluenzgrad am Transfektionstag
	COS-7	$1,8 \times 10^5$	~50 %
	HEK-293tsa	$1,6 \times 10^5$	~50 %
	CHOwt	9×10^4	~60 %

¹Angaben beziehen sich auf 35 mm Kulturschalen, die Zellzahl wurde in 2 ml Wachstumsmedium ausgesät.

Es wurden zwei verschiedene Transfektionsreagenzien, DAC-30™ (Eurogentec, Seraing, Belgien) und Roti®-Fect (Roth, Karlsruhe) verwendet. Die entsprechenden Transfektionsprotokolle wurde für die jeweilige Zelllinie optimiert. Bei Kotransfektionen verschiedener Expressionsvektoren wurde die Gesamt-DNA-Menge konstant gehalten und falls erforderlich durch Vektor ohne Insert ausgeglichen.

2.2.4.1. Bestimmung der Transfektionseffizienz

Für eine möglichst effiziente Transfektion der Zellen sind mehrere Faktoren entscheidend: u.a. die Menge der eingesetzten Vektor-DNA, der Konfluenzgrad der Zellen und die Dauer der Transfektion. Ein besonders kritischer Punkt ist das Verhältnis von DNA-Menge und Transfektionsreagenz. Diese Parameter wurden in Optimierungsexperimenten bestimmt. Hierzu wurde als Reportergen der pEGFP-C1- („Enhanced Green Fluorescent Protein“) Vektor nach den entsprechenden Protokollen transfiziert. Bei dem Green Fluorescent-Protein handelt es sich um ein Eiweiß, das nach geeigneter Anregung grünes Fluoreszenzlicht abgibt. Der pEGFP-C1 Vektor enthält eine Variante des Wildtyp GFP („Green Fluorescent Protein“), das eine hellere Fluoreszenzintensität besitzt und sich in Mammalierzellen besser exprimieren läßt. Das Anregungsmaximum liegt bei $\lambda = 488$ nm und das Emissionsmaximum bei $\lambda = 507$ nm. Die Transfektionseffizienz läßt sich über den relativen Anteil der im Fluoreszenzmikroskop hellgrün leuchtenden Zellen gegenüber nicht fluoreszierenden Zellen er-

mitteln. Wir haben die Transfektionseffizienz mit DAC-30™ für HEK-293tsa- und COS-7-Zellen ermittelt. Da die Transfektion von CHOwt-Zellen mit DAC-30™ keine zufriedenstellenden Effizienzen erzielte, wurde für diese Zelllinie Roti®-Fect eingesetzt. In Tabelle 2.5. sind die Bedingungen unter denen die stärkste Fluoreszenz der Zellen beobachtet werden konnte, zusammengefaßt.

Tabelle 2.5.: Bestimmung der Transfektionseffizienz mit pEGFP-C1-Vektor (für 35 mm Kulturschalen)

	HEK-293tsa	COS-7	CHOwt
DAC-30™	4 µg	10 µg	—
Roti®-Fect	—	—	10 µl
pEGFP Vektor DNA	2 µg	2 µg	2 µg
Transfektionseffizienz	~40 %	~40 %	~40 %

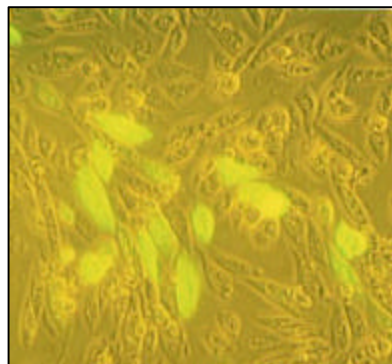


Abb. 2.2.: CHOwt-Zellen nach Transfektion mit pEGFP-C1-Vektor

Zur Kontrolle der jeweiligen Transfektionseffizienz wurde routinemäßig bei jedem Experiment eine Zellkulturschale mit dem pEGFP-C1-Vektor transfiziert und fluoreszenz-mikroskopisch ausgewertet.

2.2.4.2. Transfektion mit DAC-30ä

DAC-30™ wurde routinemäßig zur Transfektion von COS-7- und HEK-293tsa- Zellen u.a. zur Messung der MAP-Kinase-Aktivität verwendet. Prinzip dieser Transfektionsmethode ist die Bindung negativ geladener Vektor DNA an DAC-30™, das eine Liposomenformulierung eines monokationischen Cholesterol-Derivates ist. Es wird ein stabiler Komplex aus Liposomen und DNA gebildet, der von den Zellen aufgenommen werden kann.

Im folgenden ist eine Transfektion mit DAC-30™ für Zellen einer 35 mm Kulturschale beschrieben. Zunächst wurde das Wachstumsmedium gegen 1 ml DME-Medium mit 10 % (v/v)

FBS ohne Antibiotika ersetzt. Laut Herstellerinformation kann in Anwesenheit von Antibiotika während der nachfolgenden Schritte die Transfektionseffizienz gemindert werden. Für jeden Transfektionsansatz wurde in zwei Polystyrenröhrchen 500 µl DME-Medium (ohne Zusätze) vorgelegt. In je eines der Röhrchen wurde DAC-30™ bzw. Vektor-DNA (siehe Tabelle 2.6.) pipettiert und kurz gemischt. Es folgte eine Inkubationszeit von 20 min bei RT, in der sich stabile Komplexe aus Vektor-DNA und Liposomen bilden sollten. Danach wurde das Transfektionsgemisch tropfenweise zu den Zellen pipettiert, wobei versucht wurde, das Transfektionsgemisch gleichmäßig über die Fläche der Zellkulturschale zu verteilen. Es folgte eine weitere mindestens 3 h lange Inkubation der Zellen bei 37 °C im Brutschrank. Danach wurde 1 ml DME-Medium mit 20 % (v/v) FBS zu den Zellen gegeben, so daß eine Endkonzentration von 10 % (v/v) FBS im Medium vorlag, die eine optimale Versorgung der Zellen mit Nährstoffen gewährleisten sollte. Am folgenden Tag wurde das Transfektionsmedium entweder gegen Wachstumsmedium (Herstellung von Ganzzelllysaten) oder gegen serumfreies DME-Medium (Messung der MAP-Kinase-Aktivität) ausgetauscht. In allen Fällen wurden die transfizierten Zellen 48 h nach der Transfektion aufgearbeitet. Dieser Zeitraum ermöglicht erfahrungsgemäß eine maximale Expression der durch die Vektor-DNA kodierten Proteine.

Tabelle 2.6.: Konzentration von DAC-30™ und Vektor-DNA bei der Transfektion von HEK-293tsa- bzw COS-7-Zellen (für 35 mm Zellkulturschalen):

Zelllinie	HEK-293tsa	COS-7
DAC-30™	4 µg	10 µg
Vektor-DNA	2µg	2 µg

2.2.4.3. Transfektion mit Roti[®]-Fect

Im Falle von CHOwt-Zellen wurde mit dem Transfektionsreagenz DAC-30™ keine befriedigende Transfektion erzielt. Laut Hersteller lassen sich CHO-Zellen mit dem Transfektionsreagenz Roti[®]-Fect gut transfizieren, so daß wir für die Versuche an CHOwt-Zellen dieses Reagenz verwendet haben. Roti[®]-Fect, eine Liposomenformulierung eines polykationischen Lipids in Verbindung mit einem neutralen Kolipid, kondensiert DNA in kompakte Strukturen und ermöglicht deren hocheffiziente Aufnahme in Säugerzellen.

Im nachfolgenden ist eine Transfektion mit Roti[®]-Fect für Zellen einer 35 mm Kulturschale geschildert. Auch bei dieser Methode wurde auf Antibiotika-Zusätze während der Trans-

fektion verzichtet. Zunächst wurden Transfektionsreagenz und die zu transfizierende Vektor-DNA auf RT erwärmt und sanft gemischt. In zwei Reaktionsgefäßen aus Polystyrol wurden jeweils 60 µl DME-Medium ohne Serum- und Antibiotikazusatz vorgelegt und 10 µl Roti[®]-Fect bzw. 2 µg Vektor-DNA zupipettiert. Die Ansätze wurden vorsichtig gemischt und zusammengegeben. Nach erneutem Mischen folgte eine Inkubation von 20 - 40 min bei RT. In dieser Zeit sollten sich die DNA-Lipid-Komplexe ausbilden.

Zwischenzeitlich wurden die Zellen mit 1 ml PBS gespült und die Kulturschale mit 0,8 ml serumhaltigen Medium (10 %, v/v) ohne Antibiotika befüllt. Die Anwesenheit von FBS soll bei diesem Transfektionsreagenz laut Herstellerangabe eine optimale Transfektionseffizienz sicherstellen. Die DNA-Lipid-Komplexe wurden dann zu den Zellen pipettiert und durch Schwenken der Kulturschale verteilt. Es folgt eine Inkubation von 6 h bei 37 °C in einem CO₂-Inkubator. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1,2 ml Wachstumsmedium gestoppt. Das Medium wurde nach 24 h (von Beginn der Transfektion an gerechnet) ausgewechselt. Bei einigen Experimenten war eine Wachstumsarretierung der Zellen durch Serumentzug notwendig. In diesen Fällen wurde DME-Medium mit 0,4 % (v/v) FBS und Antibiotika verwendet. Erfahrungsgemäß war nach 48 h das Optimum der transienten Expression erreicht, so daß zu diesem Zeitpunkt die weitere Aufarbeitung der Zellen erfolgte.

2.2.5. Proteinbiochemische Methoden

Für die weiteren Experimente wurden Zellysate bzw. Membranfraktionen der transient transfizierten Zellen benötigt. Im folgenden sind die Methoden zur Herstellung dieser Zellfraktionen beschrieben.

2.2.5.1. Präparation von Zellysaten

Herstellung von Ganzzellysaten:

Für den Nachweis der Expression Epitop-markierter Gß-Proteine (siehe 2.2.2.) wurden Ganzzellysate von HEK-293tsa- bzw. CHOwt-Zellen hergestellt.

Dazu wurden die Zellen 48 h nach der Transfektion mit Membran-Waschpuffer (300 µl/ 35 mm Zellkulturschale) abgespült und durch mehrfaches Pipettieren eine Einzelzellsuspension gewonnen. Ein Aliquot (20 µl) wurde für die Proteinbestimmung entnommen, während die übrige Zellsuspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -70 °C gelagert wurde. Basierend auf dem Ergebnis der Proteinbestimmung wurde die tiefgefrorene

Zellsuspension so mit 3x Laemmli-Probenpuffer verdünnt, daß sich eine finale Proteinkonzentration von 2 µg/µl ergab.

Nach dem Einfrier-/Auftauzyklus wurden die Zellen durch 5-minütiges Erhitzen auf 95° C weiter lysiert und durch wiederholtes Passieren (etwa 10 x) durch eine 21G-Kanüle weiter homogenisiert. Debris wurden durch eine anschließende Zentrifugation (14000 x g, 1 min) pelletiert. Das Zellysate (Überstand) wurde in ein frisches Reaktionsgefäß pipettiert und gewöhnlich direkt weiteren Analysen zugeführt. Falls erforderlich konnte das Lysat auch bei -20 °C gelagert werden.

Herstellung von Zellysaten in RIPA-Puffer:

Da es sich im Falle des PDGF-Rezeptors um ein Transmembranprotein und im Falle der G-Proteine um membranassoziierte Proteine handelte, die beispielsweise für die PTX-katalysierte *in vitro* ADP-Ribosylierung (siehe 2.2.9.) präzipitiert werden sollten, war es von außerordentlicher Wichtigkeit, diese Proteine möglichst effizient aus der Zellmembran herauszulösen. Daher wurde für diese Lyse ein sogenannter RIPA-Puffer, dem verschiedene Proteaseinhibitoren und Detergenzien zugesetzt waren, verwendet.

War eine Wachstumsarretierung durch Serumentzug notwendig, so wurden die Zellen 24 h lang vor der Lyse in DME-Medium mit 0,4 % (v/v) FBS kultiviert. Anschließend erfolgte meist eine Stimulation mit dem Agonisten, häufig PDGF. Nach der Stimulation wurden die Zellen einmal mit eiskaltem PBS Puffer gewaschen und anschließend in RIPA-Puffer (200 µl / 35mm Schale) auf Eis unter leichtem Schütteln lysiert. Nach 15-minütiger Lyse wurden die Zellen abgekratzt und das Lysat in Reaktionsgefäße überführt. Es folgte eine Zentrifugation von 15 min bei 4 °C und 14000 x g um Debris abzutrennen. Die resultierenden Überstände wurden dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und ein Aliquot (10 µl) für die Proteinbestimmung entnommen. Die Lysate wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

2.2.5.2. Membranpräparation

Für die Analyse von G-Proteinen wurden in einer Reihe von Versuchen Zellmembranpräparationen verwendet. So wurden für die Kontrolle der Aktivität von PTX NIH3T3-Zellen 16 h lang mit PTX (100 ng/ml) behandelt, um anschließend durch *in vitro* Behandlung mit PTX den Grad der bereits *in vivo* erfolgten ADP-Ribosylierung abzuschätzen. Als Positivkontrolle für die ADP-Ribosylierungsexperimente wurde rekombinantes Gα_{i2} verwendet, das

in Membranen von Sf9-Insektenzellen überexprimiert wurde. In allen diesen Fällen erfolgte die Herstellung einer kruden Membranfraktion um die genannten G-Proteine anzureichern.

Die Zellen wurden durch Stickstoffkavitation lysiert. Das Prinzip der Methode besteht darin, daß Zellen in einer Stickstoffatmosphäre unter hohem Druck (~50 bar) inkubiert werden. Hierdurch kommt es zur physikalischen Lösung von Stickstoff in den Zellen. Wird der Druck plötzlich abgelassen, geht der Stickstoff in den Zellen wieder in die Gasphase über und es kommt zur Lyse der Zellen. Diese Methode gilt im allgemeinen als besonders schonend.

Die von der Zellkulturschale abgelösten Zellen wurden zunächst zentrifugiert (84 x g, 8 min, RT) und mit PBS-Puffer gewaschen. Das gewonnene Pellet wurde dann in 30 ml Lysepuffer resuspendiert. Durch Stickstoffkavitation (~50 bar, 15 - 20 min, 4 °C) wurden die Zellen aufgeschlossen. Das erhaltene Zellhomogenat wurde zentrifugiert (2500 x g, 10 min, 4 °C) um Zelldebris und Nuklei zu pelletieren. Der Überstand (~25 ml) wurde anschließend in ein neues Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert (15000 x g, 15 min, 4 °C, Sorvall-Zentrifuge, SS-34-Rotor). Die durch diese differentielle Zentrifugation pelletierten Zellmembranen wurden dann in 1 - 2 ml Waschpuffer resuspendiert, durch mehrfache Passage durch eine 21G-Kanüle homogenisiert und schließlich mit Waschpuffer auf 30 ml aufgefüllt. Die Zentrifugation und der folgende Waschvorgang wurden wiederholt. Danach wurde das Pellet schließlich, entsprechend seiner Größe, in 100 - 200 µl Waschpuffer aufgenommen und abschließend noch einmal durch Passage durch eine 21G-Kanüle homogenisiert. Ein Aliquot (15 µl) wurde für die Proteinbestimmung entnommen und die übrige Probe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

2.2.5.3. Proteinbestimmung nach Pierce

Proteinbestimmungen wurden mit dem BCA Protein Assay Reagent Kit von Pierce durchgeführt. Diese Methode kombiniert die klassische Biuretreaktion mit einer hochsensitiven, colorimetrischen Detektion mittels BCA (Smith et. al., 1985). Zweiwertige Kupferionen, die an die Peptidbindungen von Proteinen angelagert sind, werden im alkalischen Milieu zu einwertigen Kupferionen reduziert. Diese einwertigen Kupferionen bilden mit BCA einen violetten Komplex. Dieser wasserlösliche Komplex zeigt eine starke Absorption bei $\lambda = 562$ nm, die mit zunehmender Proteinkonzentration über einen Bereich von 20 - 2000 µg/ml linear ist.

Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe von BSA bekannter Konzentration hergestellt. Die zu messenden Proben wurden so verdünnt, daß der Extinktionswert im linearen Teil der

Eichkurve lag. Zu je 50 µl von Standard und Probe wurden 1 ml des BCA-Reagenz (50 Teile Reagenz A + 1 Teil Reagenz B) pipettiert und 30 min lang bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei $\lambda = 562 \text{ nm}$ im Spektralphotometer gemessen. Die Proteinkonzentration wurde nach linearer Regression unter Verwendung der Eichpunkte bestimmt.

2.2.5.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE werden die Proteine unter denaturierenden Bedingungen in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes aufgetrennt (Laemmli, 1970).

Es wurden SDS-Gelelektrophoresen sowohl mit festprozentigen Gelen, als auch mit Gradientengelen durchgeführt. Durch die Verwendung von Gradientengelen, bei denen sich die Porengröße innerhalb der Gelmatrix linear oder exponentiell verändert, wird eine Verbesserung des Auflösungsverhaltens erreicht. Die SDS-PAGE wird im folgenden am Beispiel eines Gradientengels erläutert.

Zwei mit Wasser und SDS gereinigte Glasplatten (18 cm x 18 cm) wurden mit Abstandshaltern aus Kunststoff auf den gewünschten Abstand (in der Regel 0.75 mm) gebracht. Die Glasplatten wurden fixiert und in einem Gelgießstand eingespannt. Zunächst wurde das Verschlußgel eingefüllt (ca. 1 cm vom unteren Rand). Zwischenzeitlich wurden die beiden entsprechenden Trenngellösungen angesetzt. Wasser, Trenngelpuffer, Acrylamid und SDS wurden zunächst vermischt und 10 min lang entgast. Anschließend wurden die Starter der Polymerisierungsreaktion, TEMED und APS, zugegeben.

Mit Hilfe einer Mischkammer wurde nun das Trenngel gegossen. In das hintere Reservoir der Mischkammer wurde bei geschlossenem Ventil die niedriger konzentrierte Trenngellösung (z.B. 8 %) gegeben, während in das vordere Reservoir die höher konzentrierte Trenngellösung (z.B. 20 %) eingefüllt wurde. Waren beide Mischkammern mit den entsprechenden Lösungen beschickt, wurde das Verbindungsventil geöffnet. Dadurch floß unter Rühren aus dem hinteren Reservoir kontinuierlich niedriger konzentrierte Trenngellösung in die vordere Kammer mit der höher konzentrierten Trenngellösung ein. Diese Anordnung hatte zu Folge, daß in der Gelkammer ein Gradient mit einer von unten nach oben abnehmenden Acrylamidkonzentration entstand. Durch den Zusatz von Saccharose zur höher konzentrierten Acrylamidlösung wurde in dieser eine noch höhere Dichte erzeugt, so daß neben dem Acrylamidkonzentrationsgradienten im Gel auch ein Dichtegradient mit von unten nach oben abfallenden spezifischen Gewicht entstand. Dadurch wurde der Gradient bis zur Polymerisation stabilisiert.

Nach Abschluß des Gießvorgangs wurde das Trenngel zum Luftausschluß mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet. Das Gel war nach ca. 20 min auspolymerisiert und das Isobutanol wurde wieder entfernt. Im Anschluß konnte nun das Sammelgel auf das Trenngel gegossen werden. Wiederum wurden die entsprechenden Komponenten des Sammelgels gemischt, entgast und zum Schluß TEMED und APS zugegeben. Es wurde ein Probenkamm in das Sammelgel eingesetzt, der nach Aushärten des Gels entfernt wurde. Anschließend konnten die Proben vorbereitet und aufgetragen werden. Die Proben wurden nach der Proteinbestimmung in entsprechender Weise mit 3x Laemmli-Probenpuffer auf eine bestimmte Konzentration (z.B. 2 mg/ml) eingestellt. Danach wurden sie zur vollständigen Denaturierung 5 min lang auf 95 °C erhitzt. Handelte es sich um Zellysate, wurden 100 - 150 µg Protein aufgetragen, handelte es sich um Zellmembranpräparationen wurden 50 µg Protein verwendet. Die Gele wurden dann in die mit 1x Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei einer Spannung von ca. 50 V bis die Proben das Trenngel erreicht hatten, dann konnte die Spannung unter Kühlung erhöht werden. In der Regel erfolgte die Elektrophorese über Nacht bei einer konstanten Spannung von 60 V.

Wurden Proteine sehr kleiner Molekulargewichtsbereiche (< 20 kDa) aufgetrennt, so wurden die Proben nicht in 3x Laemmli-Probenpuffer mit Bromphenolblau, sondern in Anwesenheit des Farbstoffs m-Kresol denaturiert. Außerdem wurden zwei unterschiedliche Laufpuffer verwendet. Als Kathodenpuffer wurde der übliche Laufpuffer eingesetzt, zusätzlich wurde ein spezieller Anodenpuffer benutzt.

Bei allen SDS-PAGE wurden geeignete Molekulargewichtsstandards mitgeführt, so der Kaleidoscope Prestained Marker (7 - 210 kDa, Bio-Rad, München), SDS-6H High Molecular Weight Standard (30 - 200 kDa, Sigma, Deisenhofen) oder SD-7 Dalton Mark VII-L (14 - 70 kDa, Sigma, Deisenhofen).

2.2.5.5. Elektrotransfer

Um die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine weiteren Analysen zugänglich zu machen, wurden sie aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dieser Transfer erfolgte als Naß-Elektrotransfer nach Towbin et al. (1979). Dazu wurde das Gel nach Beendigung der Elektrophorese entnommen. Sammelgel und untere Gelkante wurden entfernt. Gel, Nitrozellulosemembran und Whatman-Filter wurden für einige Minuten in Transferpuffer äquilibriert und anschließend in einer Halterung in definierter Reihenfolge luftblasenfrei übereinander geschichtet („Sandwich-Aufbau“). Die Halterung wurde in eine

Blotkammer der Firma Bio-Rad plazierte. Diese Kammer wurde mit Transferpuffer aufgefüllt und der Elektrotransfer bei einer Stromstärke von 0,7 - 1 A ungefähr 1 h lang (abhängig von Geldicke und Größe der Proteine) durchgeführt. Nach erfolgtem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran in Ponceau S-Lösung 10 min lang unter leichtem Schütteln angefärbt. Hierbei handelt es sich um eine reversible, wasserlösliche Färbung der Proteine auf der Membran. Durch eine Fotokopie konnte das Proteinbandenmuster und die Position der Markerbanden festgehalten werden. Die Membran konnte dann entweder sofort weiter verwendet werden oder bei -20 °C gelagert werden.

2.2.5.6. Immunologischer Nachweis von Proteinen im Westernblot

Im folgenden ist ein immunologischer Nachweis im Westernblot anhand des in dieser Arbeit am meisten verwendeten Standardprotokolls wiedergegeben.

Zunächst wurde die Nitrozellulosemembran 1 h lang in Blockierlösung geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen der Membran zu blockieren. Anschließend wurde die Membran dreimal 5 min lang in 1x TTBS gewaschen und dann mit Erstantikörper inkubiert. Dieser wurde nach Hersteller-Protokoll entsprechend verdünnt (siehe Tabelle 2.7.).

Tabelle 2.7.: Konzentrationen der verwendeten Antikörper

Konzentration Erstantikörper		Konzentration Zweitantikörper	
Anti-PDGF-Rezeptor-Ak	1:1000	Ziege anti-Kaninchen IgG-Ak	1:3000
Anti-HA-Ak	1:1000	Ziege anti-Maus IgG-Ak	1:5000
Anti-PLCγ1-Ak	1:500	Ziege anti-Kaninchen IgG-Ak	1:3000

Es erfolgte eine 1-stündige Inkubation bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Die Membran wurde wiederum dreimal 15 min lang in 1x TTBS gewaschen, um dann 45 min lang mit dem Zweitantikörper bei RT inkubiert zu werden. Danach wurde die Membran zunächst dreimal 5 min lang in 1x TTBS geschwenkt, um abschließend 5 min lang in 1x TBS ohne Tween 20 gewaschen zu werden. Immunreaktive Banden wurden mittels Chemilumineszenz nachgewiesen. Hierzu wurde die Membran mit Filterpapier kurz abgetupft und 1 min lang mit ECL-Lösung überschichtet. Anschließend konnten immunreaktive Banden durch 1 - 5-minütige Exposition der Membran (abhängig von Antikörper, Signalstärke) mit Hilfe eines Kodak X-Omat Films sichtbar gemacht werden.

Bei diesem Nachweisverfahren katalysiert die an den Zweitantikörper gebundene Peroxidase die Oxidation des im ECL enthaltenen Luminols in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid.

Das Luminol wird in einen angeregten Zustand überführt, und bei Verlagerung in den Grundzustand wird Energie in Form von Lichtquanten abgegeben, die mittels Röntgenfilmen detektiert werden kann. Dies nennt man Chemilumineszenz.

2.2.6. Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration

Ziel dieser Messungen war die Untersuchung der durch PDGF induzierten intrazellulären Ca^{2+} -Mobilisierung in humanen Hautfibroblasten und NIH3T3-Zellen.

Die Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurde mit dem fluoreszierenden Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Fura2 durchgeführt. Das Prinzip dieser Messung beruht darauf, daß bei steigender Sättigung des Farbstoffs Fura2 mit Ca^{2+} die Lichtemission bei $\lambda = 495 \text{ nm}$ nach Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 340 \text{ nm}$ zunimmt. Parallel dazu nimmt die Lichtemission bei $\lambda = 495 \text{ nm}$ nach Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 380 \text{ nm}$ mit steigender Sättigung des Farbstoffs mit Ca^{2+} ab. Der Quotient (Ratio) der gemessenen Lichtemissionen nach Anregung mit $\lambda = 340 \text{ nm}$ und $\lambda = 380 \text{ nm}$ ist proportional dem Logarithmus der freien Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle (Grynkiewicz et al., 1985).

Als Meßgerät diente ein LS50 Spektrofluorimeter der Firma Perkin Elmer, das mit einem schnell rotierenden Filterrad ausgestattet ist. Dies ermöglicht es, innerhalb einer Sekunde bis zu fünfzigmal die Anregungswellenlänge zwischen $\lambda = 340 \text{ nm}$ und $\lambda = 380 \text{ nm}$ zu wechseln. Weiterhin verfügt das Gerät über einen thermostatisierten (37°C) Küvettenhalter. Für die hier beschriebenen Experimente wurde eine Schlitzbreite des Emissionsfilters von 10 nm gewählt. Weiterhin wurden pro Sekunde 10 Meßpunkte generiert.

Primäre Hautfibroblasten aus logarithmisch wachsenden Kulturen wurden zwei Tage vor der Messung so auf 145 mm Schalen passagiert und mit frischem Wachstumsmedium versorgt, daß sie einen Konfluenzgrad von etwa 80% am Tag der Messung erreichten. Unter diesen Bedingungen betrug die Zellzahl etwa $4 - 5 \times 10^6$ Zellen / 145 mm Schale. Mit dieser Menge an Zellen konnten etwa $8 - 10$ Einzelmessungen durchgeführt werden.

Einen Tag vor der Messung wurde das Wachstumsmedium durch DME-Medium ersetzt, das nur $0,5\%$ FBS enthielt, um einen Wachstumsarrest der Zellen auszulösen. In diesem Medium verblieben die Zellen etwa $18 - 24 \text{ h}$. Aliquots dieser Zellen wurden während dieser Zeit mit 100 ng/ml PTX behandelt.

Am Meßtag wurden die Zellen durch Trypsinierung abgelöst und durch Zentrifugation ($100 \times g$; 5 min) pelletiert. Die Zellen wurden in 10 ml DME-Medium resuspendiert und Fura2-AM in einer Endkonzentration von $1 \mu\text{M}$ zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen licht-

geschützt 1 h lang bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Hierbei war darauf zu achten, daß die Zellen etwa alle 10 min resuspendiert wurden. Fura2-AM ist der Acetoxymethylester des Farbstoffs, der aufgrund seiner Lipophilie die Zellmembran passieren kann. Durch hydrolytische Spaltung des Esters wird der Farbstoff in der Zelle gefangen und angereichert. Am Ende der Beladungsperiode wurden die Zellen erneut durch Zentrifugation pelletiert, um extrazellulären Farbstoff zu entfernen. Die Zellen wurden in 10 ml HEPES-Puffer mit 1 mg/ml BSA resuspendiert und in einem lichtgeschützten Wasserbad bei 37 °C gelagert.

Für die eigentlichen Messungen wurden 500 µl dieser Zellsuspension in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und 8 sec lang bei 8000 rpm in einer Miko-zentrifuge pelletiert. Dieser Schritt war notwendig, da die Zellen Fura2 im Verlauf der Lagerung an das Umgebungsmedium abgeben können. Da in diesem Medium die Ca^{2+} -Konzentration bei etwa 1 mM, in der Zelle aber bei 100 nM - 1 µM liegt, können geringe Leckmengen des Farbstoffs im Umgebungspuffer die Messung empfindlich stören. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Zellen in 1 ml vorgewärmten HEPES-Puffer resuspendiert und anschließend in eine Küvette, die 1 ml HEPES-Puffer (37 °C) enthielt, überführt. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Messung gestartet und sobald sich ein stabiles Meßsignal etabliert hatte, wurde der jeweilige Agonist in einem Volumen von 20 µl (in der Regel verdünnt mit HEPES-Puffer) schnell zugegeben und untergemischt.

Nachdem das entsprechende Meßsignal aufgezeichnet war, erfolgte die Eichung der Ratio-Werte in intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration. Hierbei wurden die Zellen zuerst durch Zugabe von 50 µl der Digitoninlösung lysiert. Durch diesen Schritt wird der Fluoreszenzfarbstoff aus den Zellen freigesetzt und kann mit dem Ca^{2+} des Puffers (1 mM) reagieren. Unter diesen Bedingungen wird ein Maximalwert der Ratio gemessen. Anschließend wurde 50 µl der Tris-EGTA Lösung zugesetzt, die das freie Ca^{2+} vollständig cheliert. Hierbei sinkt die Ratio auf ihren Minimalwert. Unter Verwendung des K_D -Wertes von Fura2 (224 nM) für Ca^{2+} und der gemessenen Minimal- und Maximalwerte, können gemessene Ratiowerte direkt in freie Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ umgerechnet werden. Dies geschieht automatisch durch die Software des Meßgerätes unter Verwendung der Formel nach Grynkiewicz:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_D * (R_t - R_0) / (R_{\max} - R_t)$$

Hierbei steht $[\text{Ca}^{2+}]_i$ für die freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, K_D für die Dissoziationskonstante (224 nM), R_t für den gemessenen Ratiowert zum Zeitpunkt t, R_0 für die minimale Ratio nach Chelatisierung des extrazellulären Ca^{2+} bei der Eichung und R_{\max} für den Maximalwert der Ratio direkt nach Lyse der Zellen mit Digitonin.

Die Messungen wurden jeweils als Dreifachmessungen durchgeführt. Repräsentative Kurven finden sich im Ergebnisteil (siehe 3.1.).

2.2.7. Chemotaxis

Ziel dieser Messung war die Untersuchung der durch PDGF stimulierten gerichteten Wanderung von humanen Hautfibroblasten entlang einem PDGF-Gradienten. Die Messungen wurden mit einer 48-Brunnen-Mikrokammer (NeuroProbe, Cabin John, Md, USA) durchgeführt, die aus einer oberen und unteren Kammer-Platte besteht, die wiederum durch eine Filtermembran (Nucleopore, Tübingen) voneinander getrennt sind. Das Prinzip der Messung beruht darauf, daß die Zellen, die sich in den Brunnen der oberen Platte befinden, hin zum Ort eines chemotaktischen Stimulus wandern (Agonisten in Brunnen der unteren Platte). Auf diesem Weg passieren die migrierenden Zellen eine Membran, deren Porengröße auf die jeweilige Zelllinie abgestimmt ist. Die Beschichtung der Membran führt dazu, daß die Zellen nach Passage auf der Membran zurückgehalten werden. Die anschließende Anfärbung der Zellen auf der Membran ermöglicht dann eine mikroskopische Auswertung.

Primäre Hautfibroblasten aus logarithmisch wachsenden Kulturen wurden einen Tag vor der Messung so auf 145 mm Kulturschalen passagiert, daß sie am Versuchstag einen Konfluenzgrad von etwa 80 % erreichten. Nach dem Ablösen der Zellen und anschließender Zentrifugation (100 x g, 5 min) wurden die Zellen auf eine Dichte von 1×10^6 Zellen / ml (DMEM mit 20 mM HEPES, pH 7,4; 1 % BSA) eingestellt. Sollte der Effekt von PTX untersucht werden, so wurden die Zellen vor der Messung 16 h lang mit 100 ng/ml PTX vorinkubiert. Die Brunnen der unteren Kammer-Platte wurden mit 20 ng/ml PDGF (verdünnt in DMEM mit 20 mM HEPES, pH 7,4; 0,1 % BSA) oder nur Medium befüllt. Darauf wurde luftblasenfrei eine Polykarbonat-Membran (Porengröße 12 μ m), die zuvor mit Kollagen Typ I (100 μ g/ml, human) 24 h lang behandelt wurde, gelegt. Anschließend wurde die obere Kammer-Platte aufgelegt und fixiert. Je 50 μ l der Zellsuspension wurden sorgfältig eingefüllt und die Mikrokammer 24 h lang bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran abgenommen und nicht migrierte Zellen durch vorsichtiges Waschen entfernt. Die Membran wurde dann getrocknet, mit Diff-Quick®-Färbelösung (Baxter, Düringen, Schweiz) gefärbt und auf einen Objektträger aufgelegt. Die Quantifizierung migrierter Zellen erfolgte auf der Membranunterseite durch Auszählung von drei repräsentativen Bereichen eines Brunnens

unter dem Mikroskop ($\times 320$). Um den Anteil an zufällig bzw. ungerichtet gewanderten Zellen zu bestimmen, wurde zu den Zellen in einigen Brunnen PDGF zugegeben.

2.2.8. Messung der DNA-Synthese

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluß von PDGF auf die DNA-Synthese humaner Hautfibroblasten untersucht. Die hierzu durchgeführte Messung beruht auf der Quantifizierung der DNA-Syntheserate der Zellen über den Einbau von [^3H]-Thymidin.

Primäre Hautfibroblasten aus subkonfluent gewachsenen Kulturen wurden auf 24-Lochplatten in einer Dichte von 1×10^4 Zellen / Loch in Wachstumsmedium ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Wachstumsmedium durch DME-Medium ersetzt, das nur 0,5 % FBS enthielt, um einen Wachstumsarrest der Zellen auszulösen. Nach 48 h wurde das Medium abgenommen und gegen thymidinfreies MEM-Markierungsmedium ausgetauscht. Mit diesem Markierungsmedium wurde die [^3H]-Thymidin-Lösung entsprechend einer Aktivität von 1 μCi / Loch verdünnt und zu den Zellen gegeben. Gleichzeitig wurden die Zellen mit PDGF (20 ng/ml) oder FBS (10 %) stimuliert, Kontrollzellen blieben unbehandelt. Nach weiteren 2 Tagen wurde die Proliferation gestoppt, indem zunächst das Medium entfernt wurde, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und schließlich in 200 μl Lyse-Puffer (Solvable G, NEN, Bad Homburg) aufgeschlossen wurden. Die Lysate wurden durch Glasfasermembranen filtriert und in Zählgefäße überführt. Nach Zugabe von je 3,5 ml Szintillationsflüssigkeit wurde die Radioaktivität durch Szintillationszählung quantifiziert. Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt. Wurde der Einfluß von PTX untersucht, so wurden die Zellen 24 h vor Zugabe der Agonisten mit PTX (100 ng/ml) behandelt.

2.2.9. PTX-katalysierte *in vitro* ADP-Ribosylierung

Ziel dieses Versuches war der Nachweis von PTX-sensitiven G-Proteinen, die mit dem PDGF-Rezeptor koimmunpräzipitiert werden.

Bei diesem Verfahren wird durch PTX *in vitro* der Transfer von ADP-Ribose von NAD^+ (Kosubstrat) an ein C-terminales Cystein der $\text{G}\alpha_{i/o}$ -Untereinheit katalysiert (Gierschik und Jakobs, 1992). Durch die Verwendung von [^{32}P]-markiertem NAD^+ lassen sich dann über den Einbau von [^{32}P]ADP-Ribose in $\text{G}\alpha$ -Untereinheiten, $\text{G}_{i/o}$ -Proteine autoradiographisch nachweisen.

Dieses *in vitro* Nachweisverfahren wurde an Lysaten von humanen Hautfibroblasten und NIH3T3-Zellen durchgeführt.

2.2.9.1. Präparation der Zellysate in RIPA-Puffer

Zunächst wurden die Zellen in entsprechender Dichte auf 80 mm Kulturschalen ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Wachstumsmedium gegen DME-Medium mit nur 0,4 % FBS ausgetauscht. Am nächsten Tag waren die Zellen etwa zu 70 - 90 % konfluent. Zumeist wurden die Zellen mit PDGF A/B (50 ng/ml) 8 min lang bei 37 °C stimuliert. Die Stimulation wurde durch Waschen mit eiskaltem PBS-Puffer gestoppt. Nachdem das PBS wieder von den Kulturschalen abgenommen war, wurden 350 µl RIPA-Puffer zugegeben. Die Präparation der Lysate (2.2.5.1.) und die Proteinbestimmung (2.2.5.3.) erfolgte dann wie beschrieben.

2.2.9.2. Immunpräzipitation

Bei der anschließenden Immunpräzipitation wurden 500 - 1000 µg Zellysate eingesetzt. Um unspezifische Bindung an die Agarose zu reduzieren, erfolgte zunächst eine Vorreinigung („Preclearing“) der Lysate mit 25 %iger Protein A-Agarose (10 µl/µg Ak). Die Lysate wurden mindestens 10 min lang auf einem Überkopf-Schüttler bei 4 °C inkubiert, anschließend wurde die Agarose durch Zentrifugation (14000 x g, 10 min, 4 °C) pelletiert. Die Überstände wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Entsprechend der eingesetzten Lysatmenge wurden 5 - 10 µg anti-PDGF-Rezeptor-Antikörper zupipettiert und der Ansatz auf dem Überkopf-Schüttler über Nacht bei 4 °C inkubiert. Um die gebildeten Immunkomplexe zu präzipitieren, wurde diesem Reaktionsansatz eine entsprechende Menge 25%ige Protein A-Agarose (50 - 100 µl) zugegeben und mindestens 2 h lang bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Die Immunpräzipitate wurden anschließend je zweimal mit eiskaltem RIPA-Puffer und je zweimal mit eiskaltem Reaktionspuffer gewaschen.

2.2.9.3. PTX-Aktivierung

Für die durch PTX katalysierte *in vitro* ADP-Ribosylierung war es notwendig, das PTX zuvor zu aktivieren. PTX ist ein Hexamer und besteht aus den Proteinuntereinheiten S1 (A-Protomer) und dem B-Oligomer (S2, S3, S4-Dimer und S5). Die S1-Untereinheit besitzt die enzymatische Aktivität, die den Transfer der ADP-Ribose von NAD⁺ an Cystein katalysiert. Durch Reduktion von Disulfidbrücken-Bindungen wird S1 vom B-Oligomer abgespalten und

aktiviert. Dazu wurden 5 µl (500 ng) PTX mit 5 µl 200 mM DTT und 1 µl einer 2,5 %igen SDS-Lösung 20 min lang bei 32 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Zur Stabilisierung wurden anschließend 10 µl einer 1 mg/ml BSA-Stammlösung zu diesem Ansatz pipettiert.

2.2.9.4. PTX katalysierte *in vitro* ADP-Ribosylierung

Zu den Immunpräzipitaten wurden jeweils 50 µl Reaktionspuffer mit aktiviertem PTX (20 µg/ml), 6 µCi [³²P]NAD⁺ (150 nM) und 12,5 nM NAD gegeben. Der Ansatz wurde gemischt und 1 h lang bei 30 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 µl 3x Laemmli-Probenpuffer gestoppt. Anschließend wurden die Proben 5 min lang bei 94 °C denaturiert. Die Protein A-Agarose wurde durch Zentrifugation (14000x g, 1 min) pelletiert. Der Überstand wurde auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke von 10 mA über ca. 16 h. Am folgenden Tag wurde das Gel getrocknet und dann 24 h lang gegen eine Spezialfolie exponiert, die mit Hilfe eines PhosphoImaging-Systems analysiert wurde. Bei dieser *in vitro* ADP-Ribosylierungsreaktion wurden verschiedene Kontrollen mitgeführt:

Zur Spezifitätskontrolle der Immunreaktion wurde a) eine Immunpräzipitation mit Prä-immunserum (Kaninchen) durchgeführt und b) einem Lysat kein Antikörper zugegeben. Zur Kontrolle der biologischen Aktivität des verwendeten PTX und Verifizierung der Position der Signale im Gel wurden Membranen von NIH3T3-Zellen, die *in vivo* in An- oder Abwesenheit von PTX kultiviert worden waren, mitgeführt. Außerdem wurden Membranen von Gα_{i2}-exprimierenden Sf9-Zellen als Positivkontrolle ADP-ribosyliert.

2.2.10. Messung der MAP-Kinase-Aktivität

Die MAP-Kinase-Aktivität wurde in einem *in vitro* Immunkomplex-Kinase-Assay (Meloche et al., 1992) gemessen. Prinzip dieser Methode ist die Kotransfektion einer HA-markierten MAP-Kinase (HA-erk1) mit Gβ- und Gγ-Untereinheiten in HEK-293tsa- oder COS-7-Zellen. Über die HA-Markierung kann die exprimierte MAP-Kinase spezifisch immunpräzipitiert werden. Anschließend wird ihr Aktivitätsgrad über die Phosphorylierung des MAP-Kinase Substrats MBP quantifiziert.

2.2.10.1. Präparation der Zellysate

HEK-293tsa- und COS-7-Zellen wurden wie bereits beschrieben (siehe 2.2.4.2.) mit den entsprechenden Expressionsvektoren transfiziert. Außerdem wurde HA-erk1 (0,2 µg / 35 mm Zellkulturschale) kotransfiziert. Die Zellen wurden vor der Präparation der Lysate 24 h lang unter serumfreien Bedingungen kultiviert und vor der Lyse ggf. mit Agonisten stimuliert. Serumfreie Bedingungen sollten eine Vorstimulation der Zellen durch im FBS enthaltene Wachstumsfaktoren vermeiden. Anschließend erfolgte die Präparation der Lysate (siehe 2.2.5.1.) mit einem modifizierten RIPA-Puffer, dem MAP-Kinase-Lysepuffer. Ein Aliquot (10 µl) der gewonnenen Lysate wurde für die Proteinbestimmung nach Pierce verwendet.

2.2.10.2. Immunpräzipitation

Die jeweiligen Lysate (200 µg) wurden mit 6,5 µg anti-HA(12CA5)-Antikörper über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopf-Schüttler inkubiert. In diesem Zeitraum sollten sich Immunkomplexe, bestehend aus HA-ERK1-Protein und dem anti-HA-Antikörper, bilden können. Zur Präzipitation dieser Immunkomplexe wurden anschließend 45 µl 30 %ige Protein A-Agarose zupipettiert. Es folgte eine weitere Inkubation von 2 h bei 4 °C auf dem Überkopf-Schüttler. Um ungebundene Proteine zu entfernen, wurden die Immunpräzipitate anschließend zweimal mit eiskaltem MAP-Kinase-Lysepuffer und dann zweimal mit eiskaltem Kinasepuffer, zwecks Umpufferung, gewaschen.

2.2.10.3. *In vitro* Immunkomplex-Kinase-Assay

Es folgte nun der eigentliche *in vitro* Immunkomplex-Kinase-Assay. Zu den pelletierten Immunkomplexen wurden jeweils 40 µl Kinasepuffer mit 250 µg/ml MBP, 20 µM ATP und 4 µCi [γ^{32} -P]ATP gegeben. Die Phosphorylierungsreaktion von MBP wurde 30 min lang bei RT unter leichtem Schütteln durchgeführt. Durch die Zugabe von 40 µl 2x Laemmli-Probenpuffer (mit m-Kresol) wurde die Reaktion gestoppt. Um die Proteine zu denaturieren und die Immunkomplexe von der Agarose zu lösen, wurden die Proben dann 5 min lang bei 95 °C erhitzt. Die Protein A-Agarose wurde durch Zentrifugation (14000 x g, 1 min, 4 °C) pelletiert und die Überstände der Proben auf ein 15 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 10 mA 20 h lang durchgeführt. Anschließend wurde das Gel getrocknet und etwa 24 h lang gegen eine Spezialfolie exponiert. Die Quantifizierung des [32 P]-markiertem MBP erfolgte anschließend mittels PhosphoImaging-Analyse.

2.2.11. Nachweis einer direkten Interaktion von PDGF-Rezeptor und HA-markierten G β -Proteinen

Ziel dieses Versuches war die Beantwortung der Frage, ob G β 3 bzw. G β 3s mit dem aktiviertem PDGF-Rezeptor interagieren können. Hierzu wurde eine Koimmunpräzipitation unter Verwendung von N-terminal HA-markierten G β -Proteinen als spezifisches Nachweisverfahren durchgeführt. Untersuchungen haben belegt, daß N-terminale Markierungen an G β -Proteinen nicht deren Funktion stört (Garcia-Higuera et al., 1998). Da für die Detektion von G β 3-Proteinen keine befriedigenden Antikörper zur Verfügung stehen, ermöglichte die HA-Markierung den Nachweis von mit dem PDGF-Rezeptor koimmunpräzipitierten G β -Proteinen mit einem sehr spezifischen Antikörper im Westernblot.

CHOwt-Zellen wurden wie bereits beschrieben (siehe 2.2.4.3.) mit HA-G β 1, HA-G β 3, HA-G β 3s oder nur mit Vektor transfiziert. Am folgenden Tag wurde das Wachstumsmedium gegen serumreduziertes Medium (0,4 % FBS) ausgetauscht. Nach 24 h wurden die Zellen in der Regel mit PDGF A/B (50 ng/ml Medium) 8 min lang bei 37 °C stimuliert. Nachdem die Stimulation durch die Zugabe von eiskaltem PBS-Puffer gestoppt war, wurden 150 μ l RIPA-Puffer pro 35 mm Kulturschale zugegeben und die Präparation der Lysate (2.2.5.1) und die Proteinbestimmung (2.2.5.3.) erfolgte wie beschrieben. Bei der anschließenden Immunpräzipitation wurde der PDGF-Rezeptor mit einem anti-PDGF-Rezeptor-Antikörper aus 500 μ g Zellysat präzipitiert. Die Durchführung erfolgte prinzipiell wie unter 2.2.9.2. beschrieben. Die so gewonnenen Immunpräzipitate wurden hier jedoch dreimal mit eiskaltem RIPA-Puffer gewaschen und schließlich in 25 μ l 3x Laemmli-Probenpuffer resuspendiert. Die Proben wurden dann 5 min lang bei 95 °C erhitzt, die Protein A-Agarose durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand in einem 8 - 20 %igen SDS-Gelgradienten elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf Nitrozellulosemembran transferiert und der immunologische Nachweis der koimmunpräzipitierten HA-G β -Proteine erfolgte mit dem anti-HA-Antikörper (siehe 2.2.5.6.).

2.2.12. Statistik und graphische Darstellung

Für die graphische Darstellung und die mathematische Auswertung der Ergebnisse wurde das Programm „Graph Pad Prism“ (Version 3.0) verwendet. Alle Daten sind wie angemerkt als Mittelwerte \pm Standardfehler (S.E.M.) oder \pm Schwankungsbereich dargestellt. Der Vergleich der Daten erfolgte mittels „Student's-Two-Tailed t-Test“, Unterschiede wurden bei $p < 0,05$ als signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

Lange Zeit wurde die Auffassung vertreten, daß die frühe Signaltransduktion von RTK und GPCR über klar abgrenzbare Signalübertragungswege verläuft. Im Falle des EGF-Rezeptors gibt es inzwischen mehrere Befunde, die eine Interaktion von EGF-Rezeptor und PTX-sensitiven G-Proteinen wahrscheinlich machen (Yang et al., 1991; 1994). Wie bereits eingangs erwähnt, gibt es demgegenüber wenige Daten zum PDGF-Rezeptor. Daher war das Ziel unserer Untersuchungen die Analyse möglicher Interaktionen von heterotrimeren G-Proteinen, dem PDGF-Rezeptor und der PLC γ . In vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte an humanen Hautfibroblasten bereits der Nachweis geführt werden, daß die durch PDGF stimulierte IP₃-Bildung, als Ergebnis der PLC γ -Aktivierung, durch PTX deutlich gehemmt wird (Schündeln, 2001). In einer ersten Serie von Experimenten wurde nun zunächst die sich an die IP₃-Bildung anschließende intrazelluläre Ca²⁺-Mobilisierung und ihre Beeinflussbarkeit durch PTX an humanen Hautfibroblasten untersucht. Weitere Experimente dienten dann der Aufklärung der Mechanismen, wie PTX-sensitive G-Proteine an diesen Schritten beteiligt sind.

3.1. Messung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration

In einer ersten Serie von Experimenten wurde - in Anlehnung an die Befunde von Pietruck et al. (1996) - untersucht, inwieweit eine Behandlung mit PTX die durch PDGF stimulierten Ca²⁺-Signale beeinflussen kann.

Hierzu wurden Fibroblasten mit dem Ca²⁺-sensitiven Farbstoff Fura2 beladen und der Effekt von PDGF auf die Ca²⁺-Signale untersucht. In Abbildung 3.1. ist eine solche Originalmeßkurve wiedergegeben. Diese stammt aus einer Reihe von 8 unabhängigen Experimenten, die mit 4 verschiedenen Fibroblasten-Zelllinien durchgeführt wurde. Wie zu erwarten, kam es nach Stimulation mit PDGF (20 ng/ml) zu einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ([Ca²⁺]_i). Der maximale Ca²⁺-Anstieg $\Delta[Ca^{2+}]_i$ aus allen Experimenten wurde im Mittel mit 156 ± 35 nM bestimmt (siehe Abb. 3.2.). Anschließend wurden die Zellen noch mit Bradykinin (100 nM) stimuliert. Der Bradykininrezeptor in Hautfibroblasten koppelt an G α_q -Proteine (Pietruck et al., 1996). Man erkennt, daß es nach Zugabe dieses Agonisten zu einem raschen Anstieg der Ca²⁺-Konzentration kam, $\Delta[Ca^{2+}]_i$ betrug dabei 385 ± 60 nM. Man erkennt weiter die deutlichen - auch aus der Literatur bekannten - Unterschiede im

Zeitverlauf des Ca^{2+} -Signals zwischen PDGF-Rezeptor-Stimulation und Aktivierung eines GPCR.

Wurden Vergleichszellen mit PTX behandelt, so kam es zu einer signifikanten Hemmung - aber keiner vollständigen Blockade - des durch PDGF stimulierten Ca^{2+} -Signals ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ 85 ± 13 nM, $p < 0,05$). Erwartungsgemäß wurde das Bradykinin-Signal durch die Behandlung mit PTX nicht beeinflusst ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ 353 ± 44 nM), da der Bradykininrezeptor Signale über PTX-insensitive G-Proteine weiterleitet.

Somit bleibt festzuhalten, daß eine Behandlung mit PTX die durch PDGF stimulierten Ca^{2+} -Signale humaner Hautfibroblasten hemmt. Dies kann als ein erster Hinweis auf die Beteiligung PTX-sensitiver G-Proteine an der Signalübertragung von PDGF gewertet werden und bestätigt frühere Befunde (Pietruck et al., 1996). Andererseits belegen die Untersuchungen zu den Bradykinin-Signalen, daß PTX nicht unspezifisch alle durch Agonisten ausgelösten Ca^{2+} -Signale dieser Zellen unterdrückt, was als ein erster Hinweis auf die Spezifität der durchgeführten Behandlung angesehen werden kann.

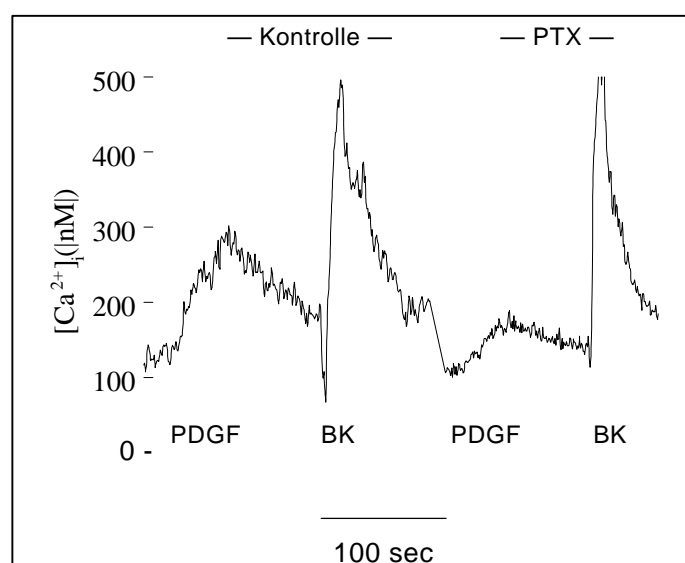


Abb. 3.1.: Effekt von PTX auf die durch Agonisten stimulierten Ca^{2+} -Signale in humanen Hautfibroblasten

Humane Hautfibroblasten wurden 24 h lang in serumreduzierten Medium kultiviert und dann weitere 16 h lang mit PTX (100 ng/ml) inkubiert oder blieben unbehandelt. Nach Beladung der Zellen mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Fura2 wurden die Ca^{2+} -Signale nach Stimulation der Zellen mit PDGF (20 ng/ml) und Bradykinin (BK, 100 nM) gemessen. Die dargestellte Meßkurve gehört zu einer Serie von 8 unabhängigen Experimenten mit 4 verschiedenen Hautfibroblasten-Linien, wobei die Messungen jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.

Die Spezifität von PTX wurde dann durch weitere Experimente, in denen die Zellen mit LPA (100 nM) bzw. SPP (100 nM) stimuliert wurden, belegt. Hierbei handelt es sich um Agonisten für Rezeptoren, die bekanntermaßen ihre Signale über PTX-sensitive G-Proteine

weiterleiten (Pietruck et al., 1997; Spiegel und Milstien, 2000). Erwartungsgemäß wurde sowohl durch LPA ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ 359 ± 26 nM) als auch durch SPP ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ 383 ± 46 nM) ein deutlicher Ca^{2+} -Anstieg in diesen Zellen induziert. Eine PTX-Behandlung führte zu einer signifikanten Hemmung der durch LPA ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ 88 ± 20 nM, $p < 0,05$) bzw. SPP ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ 107 ± 17 nM, $p < 0,05$) induzierten Ca^{2+} -Signale.

In der folgenden Abbildung 3.2. sind die Ergebnisse aus den 8 unabhängigen Experimenten für die durch PDGF induzierten $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ zusammengefaßt. In der Abbildung repräsentiert jedes Symbol die Ergebnisse, die mit primären Hautfibroblasten eines Spenders gewonnen wurden. Man erkennt, daß es interindividuell eine deutliche Schwankungsbreite in den Ca^{2+} -Antworten gab. Bei allen Zelllinien kam es jedoch durch die Behandlung mit PTX zu einer deutlichen Hemmung der durch PDGF ausgelösten Ca^{2+} -Signale.

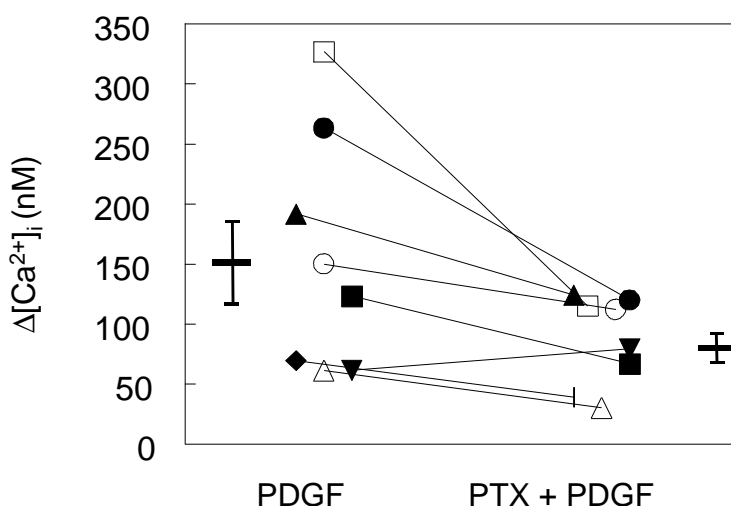


Abb. 3.2.: Effekt von PTX auf die durch PDGF induzierten Ca^{2+} -Signale in humanen Hautfibroblasten

Wiedergegeben sind die Mittelwerte für den maximalen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) nach Stimulation der Zellen mit PDGF (20 ng/ml) aus 8 unabhängigen Messungen, dargestellt durch unterschiedliche Symbole. Hierzu wurden humane Hautfibroblasten mit PTX (100 ng/ml) 16 h lang vorbehandelt („PTX + PDGF“) oder blieben unbehandelt („PDGF“). Die Mittelwerte \pm S.E.M. sind für jede Gruppe am Seitenrand gezeigt.

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, daß PTX-sensitive G-Proteine in der Signaltransduktion von PDGF eine Rolle einnehmen. Studien anderer Arbeitsgruppen waren wie ausgeführt zu anderen Ergebnissen gekommen (Letterio et al., 1986). Diese Untersuchungen wurden meist an etablierten Zelllinien durchgeführt. Um diesen Widerspruch zu unseren Ergebnissen zu lösen, haben wir daher auch die durch PDGF stimulierten Ca^{2+} -Signale in einer permanenten Zelllinie - NIH3T3 - untersucht. In Abbildung 3.3. ist eine repräsentative Meßkurve für 8 unabhängige Experimente dargestellt. Der durch PDGF stimulierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg ist dem in Hautfibroblasten in Form und Zeitverlauf ähnlich. Interessanterweise

führte die Vorbehandlung der Zellen mit PTX hier nicht zu einer Hemmung des durch PDGF stimulierten Ca^{2+} -Signals.

Dieser Befund deutet auf Unterschiede zwischen primären und etablierten Zelllinien hinsichtlich der Beteiligung PTX-sensitiver G-Proteine an der Signaltransduktion von PDGF hin.

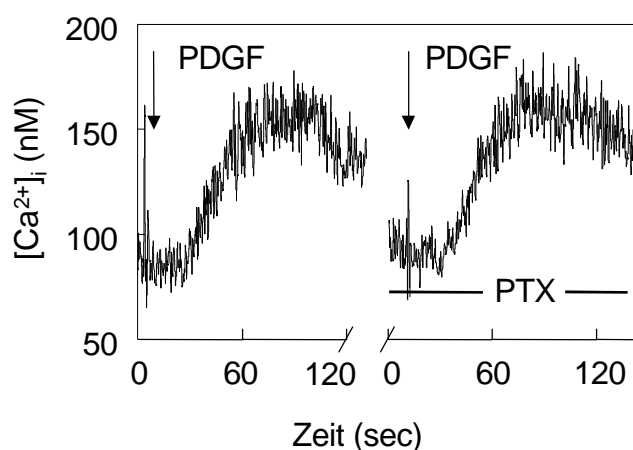


Abb. 3.3.: Effekt von PTX auf die durch PDGF induzierten Ca^{2+} -Signale in NIH3T3-Zellen

NIH3T3-Zellen wurden 24 h lang in serum-reduzierten Medium kultiviert und mit PTX (100 ng/ml, 16 h) inkubiert bzw. nicht mit PTX vorbehandelt. Die Zellen wurden mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Fura2 beladen und die Ca^{2+} -Signale nach Stimulation mit PDGF (20 ng/ml) gemessen. Die Pfeile bezeichnen die Zugabe von PDGF. Dargestellt ist eine repräsentative Meßkurve aus 8 unabhängigen Experimenten, wobei jede Messung in Triplikaten durchgeführt wurde.

3.2. Nachweis einer direkten Interaktion von PTX-sensitiven G-Proteinen, PDGF-Rezeptor und PLC 

In den vorangegangenen Untersuchungen an humanen Hautfibroblasten konnte gezeigt werden, daß die durch PDGF induzierte IP_3 -Bildung und Ca^{2+} -Mobilisierung - die sich chronologisch der PLC -Aktivierung anschließen - durch eine PTX-Behandlung gehemmt werden. In weiteren Experimenten sollte daher der Frage nachgegangen werden, ob es zu einer direkten Assoziation von aktiviertem PDGF-Rezeptor mit PTX-sensitiven G-Proteinen kommt. Weiterhin sollte geklärt werden, ob an einer solchen potentiellen Interaktion auch die PLC  beteiligt ist. Aus diesen Gründen wurde der PDGF-Rezeptor bzw. die PLC  mit geeigneten Antikörpern aus Zellysaten von humanen Hautfibroblasten präzipitiert. In einer anschließenden durch PTX katalysierten *in vitro* ADP-Ribosylierungsreaktion, die ein sensitives und spezifisches Nachweisverfahren für PTX-sensitive G-Proteine darstellt, wurde die Koimmunpräzipitation von G_i -Proteinen (G_o -Proteine waren in Fibroblasten nicht nachweisbar) untersucht. Ebenso wurden diese Experimente mit Zellysaten von Mausfibroblasten (NIH3T3) durchgeführt. Dabei sollte untersucht werden, ob sich die erhobenen Befunde von Zellen aus Primärkultur von denen etablierter Zelllinien unterscheiden. Im Falle des EGF-

Rezeptors gibt es in der Literatur deutliche Hinweise für ein solches Phänomen (Yang et al., 1991; 1994).

3.2.1. Immunpräzipitation des PDGF-Rezeptors

Nicht jeder Antikörper, der für die Westernblot-Analyse verwendbar ist, ist auch für eine Immunpräzipitation geeignet. Daher wurde zunächst der von uns gewählte anti-PDGF-Rezeptor-Antikörper in einer Immunpräzipitation (siehe 2.2.9.2.) getestet.

Die entsprechenden Zelllinien (NIH3T3, humane Hautfibroblasten) wurden 24 h lang vor Präparation der Lysate in serumreduziertem Medium (0,4 % FBS) kultiviert und dann mit PDGF (50 ng/ml) 8 min lang bei 37 °C stimuliert. Der PDGF-Rezeptor wurde mit anti-PDGF-Rezeptor-Antikörper aus den Zellysaten präzipitiert, die gewaschenen Immunkomplexe in einem 7,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel (Minigel-System) aufgetrennt und anschließend mittels Elektroblob auf Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis des Rezeptors im Präzipitat erfolgte ebenfalls mit anti-PDGF-Rezeptor-Antikörper. Als PDGF-Rezeptor-Positivkontrolle wurde ein NIH3T3-Lysat vom Hersteller mitgeführt. Außerdem wurden Zellysate der Proben aufgetragen. Abbildung 3.4. zeigt das Ergebnis eines solchen Immunoblots für eine Immunpräzipitation des PDGF-Rezeptors aus NIH3T3-Lysaten nach Stimulation mit PDGF.

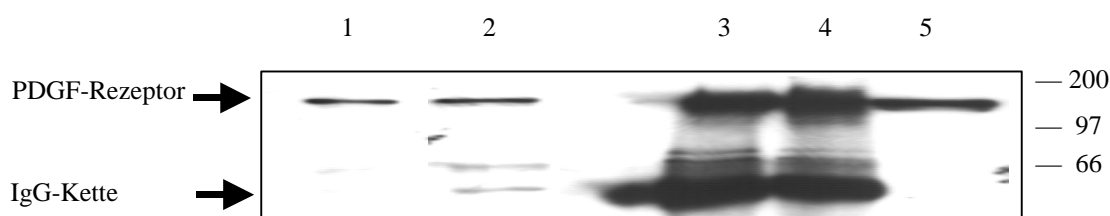


Abb. 3.4.: Immunpräzipitation des PDGF-Rezeptors aus NIH3T3-Zellysaten

NIH3T3-Zellen wurden 8 min lang bei 37 °C mit PDGF (50 ng/ml) stimuliert. Mit den Zellysaten (500 µg) wurde eine Immunpräzipitation mit anti-PDGF-Rezeptor-Antikörper durchgeführt. Immunpräzipitierte Proteine (Spur 3, 4), Zellysate (Spur 1, 2) und Positivkontrolle (Spur 5) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Der immunologische Nachweis des PDGF-Rezeptors erfolgte mit anti-PDGF-Rezeptor-Antikörper. An der rechten Seite sind die Molekulargewichtsstandards in kDa angegeben.

In den Präzipitaten (Spur 3 und 4) fand sich ein deutliches Signal bei ~180 kDa. Durch Vergleich dieser Bande mit dem Signal der Positivkontrolle (Spur 5) wurde diese Bande als PDGF-Rezeptor identifiziert. Ebenso konnte auch in den Zellysaten der Proben (Spur 1 und 2) der PDGF-Rezeptor detektiert werden. Dieses Ergebnis zeigt, daß der verwendete Antikörper für eine Immunpräzipitation des PDGF-Rezeptors geeignet ist. Das Signal bei

~52 kDa ist als unspezifische Nebenreaktion anzusehen. Es handelte sich hierbei um die schwere IgG-Kette des PDGF-Rezeptor-Antikörpers.

3.2.2. Nachweis einer Assoziation von PDGF-Rezeptor und G_i -Proteinen mittels PTX-katalysierter *in vitro* ADP-Ribosylierung

Nachdem die Präzipitation des PDGF-Rezeptors aus Zellysaten der betreffenden Zelllinien etabliert war, sollte nun die Assoziation von PDGF-Rezeptor und PTX-sensitiven G -Proteinen untersucht werden. Dazu wurden primäre humane Hautfibroblasten, die 24 h lang in serumreduzierten Medium (0,4 % FBS) kultiviert worden waren, zunächst 8 min lang mit oder ohne PDGF (50 ng/ml) bei 37 °C inkubiert. Durch Reduktion der FBS-Konzentration im Medium sollte eine Vorstimulation der Zellen durch darin enthaltenes PDGF verhindert werden. Anschließend wurden Zellysate hergestellt (siehe auch 2.2.9.) und daraus der PDGF-Rezeptor mit einem spezifischen Antikörper präzipitiert. Mit den gewonnenen Immunpräzipitaten wurde eine durch PTX-katalysierte *in vitro* ADP-Ribosylierungsreaktion durchgeführt. Die präzipitierten Proteine wurden anschließend in einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zum Nachweis der mit dem PDGF-Rezeptor koimmunpräzipitierten, mit [32 P]ADP-Ribose markierten $G\alpha_i$ -Untereinheiten wurde schließlich ein Autoradiogramm vom Gel angefertigt. Solch ein repräsentatives Autoradiogramm ist in Abbildung 3.5. dargestellt.

Bereits bei unstimulierten Zellen (Spur 2 und 3) konnte ein schwaches Signal spezifisch markierter $G\alpha_i$ -Proteine beobachtet werden. Bei Zellen, die mit PDGF stimuliert worden waren (Spur 4 und 5), kam es zu einer deutlichen Zunahme an [32 P]ADP-Ribose markierten $G\alpha_i$ -Proteinen.

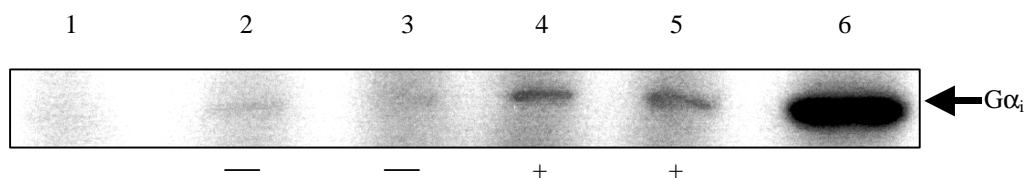


Abb. 3.5.: Koimmunpräzipitation von PDGF-Rezeptor und G_i -Proteinen aus humanen Hautfibroblasten
 Humane Hautfibroblasten wurden ohne (—; Spur 2, 3) oder mit (+; Spur 4, 5) PDGF (50 ng/ml) 8 min lang bei 37 °C inkubiert und zu Lysaten aufgearbeitet. Aus den Lysaten (1 mg) gewonnene PDGF-Rezeptor-Immunpräzipitate (Spuren 2 - 5) wurden 1 h lang mit [32 P]NAD⁺ und aktiviertem PTX für eine *in vitro* ADP-Ribosylierungsreaktion bei 30 °C inkubiert. Als Kontrolle für unspezifische Markierung wurde ein Lysat ohne Antikörper (Spur 1) aufgetragen. Als Positivkontrolle wurden Sf9-Membranen (Spur 6) mitgeführt. Die Proteine wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dargestellt ist ein Autoradiogramm mit [32 P]ADP-Ribose markierten $G\alpha_i$ -Proteinen (Pfeil) nach 24-stündiger Exposition des Gels gegen eine Spezialfolie. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Um zu prüfen, ob G-Proteine aus dem Zellysat direkt (unspezifisch) an die Protein A-Agarose binden, wurde eine Kontrolle, die ebenso wie die Präzipitate behandelt worden war, jedoch keinen anti-PDGF-Rezeptor-Antikörper enthielt, mitgeführt. In der entsprechenden Spur (Spur 1) konnte kein G-Protein-Signal identifiziert werden. Als Positivkontrolle und zur eindeutigen Identifizierung der markierten $G\alpha_i$ -Proteine bei ~ 41 kDa wurden außerdem Membranpräparationen von Sf9-Insektenzellen, die nach Infektion mit rekombinanten Baculovirus $G\alpha_{i2}$ -Proteine überexprimierten, mitgeführt (Spur 6). Erwartungsgemäß kam es hier zu einer starken Markierung.

Zum Vergleich der Ergebnisse aus unterschiedlichen Experimenten wurden die Autoradiogrammsignale mittels PhosphoImaging-System quantifiziert. In Abbildung 3.6. ist die Quantifizierung der Autoradiogrammsignale aus Abbildung 3.5. dargestellt. Nach Stimulation mit PDGF konnte ein Anstieg der spezifisch markierten $G\alpha_i$ -Proteine auf $197 \pm 2,5$ % gegenüber unstimulierten Kontrollzellen (100 ± 26 %) gemessen werden.

Zwischen den Signalen der einzelnen, unabhängigen Experimente ergab sich dabei eine gewisse Schwankungsbreite, eine Zunahme der Assoziation von $G\alpha_i$ -Proteinen mit dem PDGF-Rezeptor nach Stimulation mit PDGF konnte jedoch in allen einzelnen Experimenten nachgewiesen werden.

Diese Befunde belegen, daß in humanen Hautfibroblasten bereits G_i -Proteine mit dem nicht aktiviertem PDGF-Rezeptor assoziiert sind, und daß die Stimulation mit PDGF zu einer deutlichen Zunahme dieser Assoziation führt.

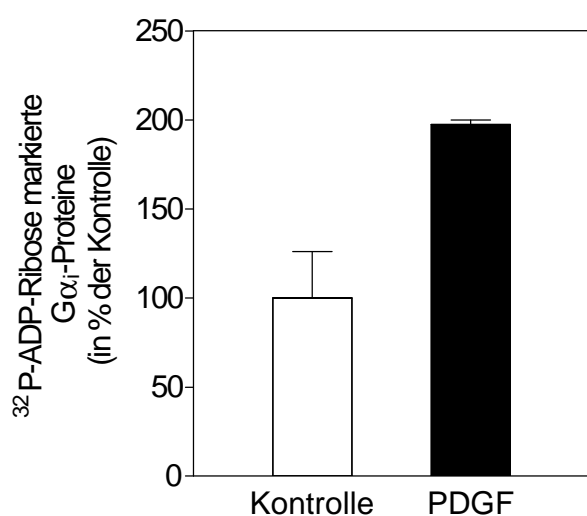


Abb. 3.6.: Assoziation von PDGF-Rezeptor und G_i -Proteinen in humanen Hautfibroblasten

Dargestellt ist die Quantifizierung der mit $[^{32}\text{P}]\text{ADP-Ribose}$ markierten $G\alpha_i$ -Proteine in PDGF-Rezeptor-Immunpräzipitaten in Prozent der Kontrolle (unstimulierte Zellen). Bei diesen Werten handelt es sich jeweils um Doppelbestimmungen eines Experiments, die Balken bezeichnen den Schwankungsbereich. Dieses Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Wie für die durch PDGF stimulierten Ca^{2+} -Signale gezeigt, bestehen hinsichtlich einer PTX-Sensitivität deutliche zelltypspezifische Unterschiede zwischen humanen Hautfibroblasten und NIH3T3-Fibroblasten. In einer weiteren Serie von Versuchen wurde daher die Assoziation von PDGF-Rezeptor und PTX-sensitiven G-Proteinen an Lysaten, die von NIH3T3-Fibroblasten stammten, untersucht. Da bereits für humane Hautfibroblasten in drei unabhängigen Experimenten der Nachweis für eine Assoziation geführt werden konnte, wurden im folgenden zwei unabhängige Versuche durchgeführt.

Der Versuchsablauf gestaltete sich ebenso wie für humane Hautfibroblasten beschrieben. Die aus NIH3T3-Lysaten gewonnen Immunpräzipitate wurden schließlich für eine durch PTX-katalysierte *in vitro* ADP-Ribosylierungsreaktion eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden Membranpräparationen von den bereits beschriebenen Sf9-Zellen mitgeführt. Es folgte eine Auftrennung der Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel, von dem schließlich ein Autoradiogramm angefertigt wurde, das in Abbildung 3.7. dargestellt ist.

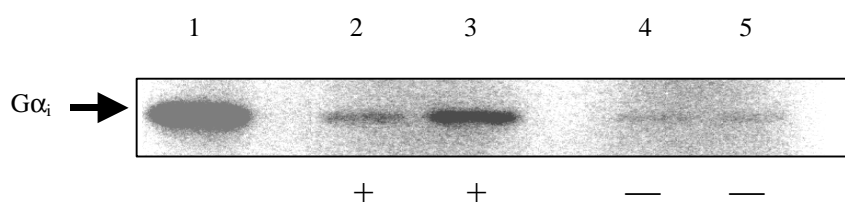


Abb. 3.7.: Koimmunpräzipitation von PDGF-Rezeptor und G_i -Proteinen aus NIH3T3-Zellen

NIH3T3 wurden mit (+; Spur 2, 3) oder ohne (—; Spur 4, 5) PDGF (50 ng/ml) 8 min lang bei 37 °C inkubiert. Aus den Lysaten (1 mg) wurde mit anti-PDGF-Rezeptor-Antikörper (Spur 2 - 5) immunpräzipitiert. Mit diesen Immunpräzipitaten wurde anschließend eine *in vitro* ADP-Ribosylierungsreaktion durchgeführt. Ebenso wurden Membranen von Sf9-Zellen (Spur 1, Positivkontrolle) *in vitro* ADP-ribosyliert. Dargestellt ist ein Autoradiogramm mit [^{32}P]ADP-Ribose markierten $G\alpha_i$ -Proteinen (Pfeil).

Bereits bei unstimulierten Kontrollzellen (Spur 4 und 5) war eine Markierung von $G\alpha_i$ -Proteinen zu erkennen. Bei Zellen, die mit PDGF stimuliert worden waren (Spur 2 und 3), konnte eine deutlich stärkere Signalintensität beobachtet werden. Dies entspricht einer Zunahme von an den PDGF-Rezeptor assoziierter $G\alpha_i$ -Proteine von $100 \pm 15 \%$ auf $931 \pm 399\%$ (siehe auch Abb. 3.8.). Die Markierung der $G\alpha_i$ -Proteine aus der Sf9-Membranpräparation (Spur 1) war wie erwartet stark.

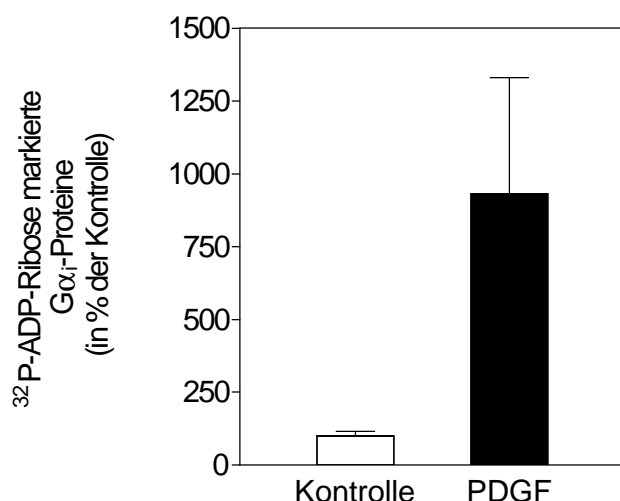


Abb. 3.8.: Assoziation von PDGF-Rezeptor und G_i-Proteinen in NIH3T3-Zellen

Dargestellt ist die Quantifizierung der mit [³²P]ADP-Ribose markierten Gα_i-Proteine in PDGF-Rezeptor-Immunpräzipitaten in Prozent der Kontrolle (unstimulierte Zellen). Es handelt sich jeweils um Doppelbestimmungen eines Experiments, die Balken geben den Schwankungsbereich an.

In Abbildung 3.9. ist das Autoradiogramm des anderen unabhängigen Experiments mit NIH3T3-Zellen dargestellt. Bei dieser PTX-katalysierten *in vitro* ADP-Ribosylierung wurden als Positivkontrolle wieder Membranpräparationen von Gα_{i2}-exprimierenden Sf9-Zellen mitgeführt. Um die biologische Aktivität und die Spezifität des verwendeten PTX zu kontrollieren, wurden NIH3T3-Zellen *in vivo* 16 h lang mit PTX (100 ng/ml) behandelt. Membranpräparationen dieser Zellen wurden anschließend noch einmal *in vitro* mit PTX behandelt.

In (A) der Abbildung 3.9. sind die mit [³²P]ADP-Ribose markierten Gα_i-Proteine aus Immunpräzipitaten unstimulierter Kontrollzellen (Spur 1) und Zellen nach Stimulation mit PDGF (Spur 2) abgebildet. Wie im vorherigen Experiment (Abb. 3.7.) konnte auch hier bereits bei unstimulierten Kontrollen (Spur 1) eine schwache Markierung von Gα_i-Proteinen beobachtet werden, die nach Stimulation mit PDGF (Spur 2) zunahm.

In (B) der Abbildung 3.9. sind die Kontrollen der PTX-Aktivität dargestellt. In den Membranen aus Gα_{i2}-exprimierenden Sf9-Zellen (Spur 3) wurde wie erwartet eine intensive Markierung von Gα_{i2} beobachtet. Bei *in vivo* mit PTX behandelten NIH3T3-Zellen (Spur 5) konnte im Gegensatz zu unbehandelten Kontrollzellen (Spur 4) keine ADP-Ribosylierung *in vitro* mehr nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse belegen die regelrechte Funktion des verwendeten PTX und zeigen ferner, daß durch die *in vivo* Behandlung mit PTX unter den gezeigten Bedingungen fast sämtliche Gα_i-Proteine modifiziert werden. Daher kann man davon ausgehen, daß bei den Versuchen unter 3.1. (Ca²⁺-Messungen) und den noch darzustellenden Experimenten unter 3.3. (Chemotaxis) und 3.4. (Proliferation) nahezu alle Gα_i-Proteine durch die PTX-Behandlung funktionell inaktiviert waren.

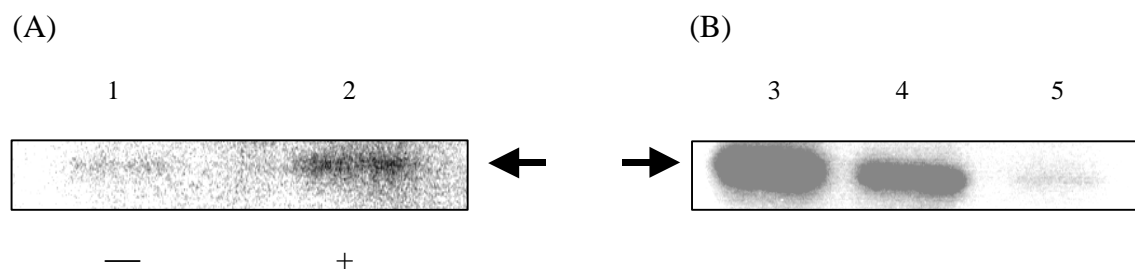


Abb. 3.9.: Koimmunpräzipitation von PDGF-Rezeptor und G_i -Proteinen aus NIH3T3-Zellen

(A) NIH3T3 wurden ohne (—, Spur 1) oder mit (+, Spur 2) PDGF (50 ng/ml) 8 min lang bei 37 °C inkubiert. Aus den Lysaten (1 mg) wurde mit anti-PDGF-Rezeptor-Antikörper (Spur 1 und 2) immunpräzipitiert und mit den Immunpräzipitaten eine *in vitro* ADP-Ribosylierungsreaktion durchgeführt. (B) Ebenso wurden Membranen von Sf9-Zellen (Spur 3) und Membranpräparationen von NIH3T3, die ohne (Spur 4) oder mit (Spur 5) PTX (100 ng/ml) *in vivo* 16 h lang behandelt worden waren, *in vitro* ADP-ribosyliert. Dargestellt ist ein Autoradiogramm mit [32 P]ADP-Ribose markierten $G\alpha_i$ -Proteinen (Pfeil).

Zusammengefaßt kommt es sowohl nach Stimulation von humanen Hautfibroblasten als auch von NIH3T3-Fibroblasten mit PDGF zu einer Zunahme der Assoziation von PTX-sensitiven $G\alpha_i$ -Proteinen mit dem PDGF-Rezeptor. Interessanterweise scheint dies aber nur im Falle der Hautfibroblasten eine funktionelle Konsequenz zu besitzen (Ca^{2+} -Signale).

3.2.3. Zeitverlauf der Assoziation von PDGF-Rezeptor und PTX-sensitiven G-Proteinen an humanen Hautfibroblasten

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte somit der Nachweis einer Interaktion von PDGF-Rezeptor und G_i -Proteinen durch Koimmunpräzipitation geführt werden.

Es sollte nun in einer nächsten Versuchsreihe der zeitliche Verlauf dieser Assoziation von PDGF-Rezeptor und PTX-sensitiven G-Proteinen nach Stimulation mit PDGF an humanen Hautfibroblasten untersucht werden. Dazu wurden in serumreduzierten Medium (0,4 % FBS) kultivierte humane Hautfibroblasten mit PDGF (50 ng/ml) unterschiedlich lange stimuliert (0 min, 1 min, 3 min, 10 min und 15 min). Die weitere Durchführung der Experimente verlief dann auf gewohnte Weise.

In Abbildung 3.10. ist das Autoradiogramm der mit [32 P]ADP-Ribose markierten 41 kDa-Proteinbanden in den Präzipitaten nach unterschiedlichen Stimulationszeiten mit PDGF dargestellt.

Bereits in unstimulierten Kontrollen konnte eine schwache spezifische Markierung von $G\alpha_i$ -Proteinen beobachtet werden. Nach 1-minütiger Stimulation mit PDGF konnte dann ein Anstieg der spezifischen radioaktiven Markierung über unstimulierten Kontrollzellen gemessen werden. Die maximale spezifische Markierung wurde bei den Zellen gemessen, die

3 min lang mit PDGF stimuliert worden waren. Anschließend kam es bei Zellen, die 10 min lang stimuliert worden waren, zu einer leichten Abnahme der mit [32 P]ADP-Ribose markierten $G\alpha_i$ -Proteine. Darauf folgte schließlich nach 15-minütiger Stimulation der Zellen mit PDGF eine weitere Abnahme der spezifischen Markierung, die sich wieder den Ausgangswerten näherte.

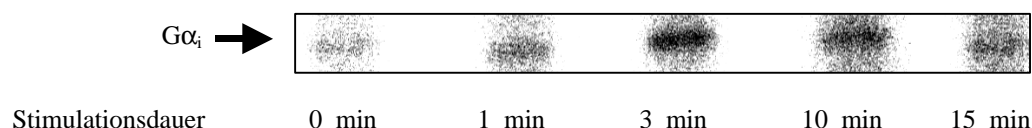


Abb. 3.10.: Zeitverlauf der Assoziation von PDGF-Rezeptor und G_i -Proteinen in humanen Hautfibroblasten

Humane Hautfibroblasten wurden vor der Lyse über unterschiedliche Zeitperioden mit PDGF (50 ng/ml) bei 37°C inkubiert. Mit den aus diesen Zellysaten gewonnenen PDGF-Rezeptor-Immunpräzipitaten wurde eine *in vitro* ADP-Ribosylierungsreaktion durchgeführt. Dargestellt ist ein Autoradiogramm mit [32 P]ADP-Ribose markierten $G\alpha_i$ -Proteinen (Pfeil). Dieses Ergebnis ist repräsentativ für zwei unabhängige Versuche.

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß bereits in humanen Hautfibroblasten, die in serumreduzierten Medium (0,4 % FBS) kultiviert werden, G_i -Proteine in Assoziation mit dem nicht aktiviertem Rezeptor vorliegen, daß eine Rezeptor-Aktivierung durch PDGF zunächst diese Assoziation verstärkt, die sich dann nach etwa 15 Minuten wieder Ausgangswerten nähert.

Wie unter 3.1. dargestellt, wurden durch eine Behandlung mit PTX die durch PDGF stimulierten Ca^{2+} -Signale humaner Hautfibroblasten gehemmt. Es liegt daher nahe zu vermuten, daß die festgestellte Interaktion von PDGF-Rezeptor mit $G\alpha_i$ -Proteinen für die Aktivierung der PLC γ von großer Bedeutung ist.

Es scheint plausibel, daß es nach Rezeptoraktivierung zur Bildung eines Multiprotein-komplexes aus Rezeptor, G_i -Protein und PLC γ kommt. Daher wurde im nächsten Schritt untersucht, ob G_i -Proteine in PLC γ -Immunpräzipitaten nachweisbar sind.

3.2.4. Nachweis einer Assoziation von PLC γ und G α_i -Proteinen mittels PTX-katalysierter *in vitro* ADP-Ribosylierung

Für diese Experimente wurde ein Antikörper verwendet, der beide Isoformen der PLC γ erkennt. Die Untersuchungsbedingungen entsprachen denen, wie sie auch für den Nachweis der Assoziation von PDGF-Rezeptor mit G α_i -Proteinen angewandt wurden.

Als Positivkontrolle wurden Membranen von Sf9-Zellen mitgeführt, die zuvor mit rekombinanten Baculoviren für G α_{i2} infiziert worden waren. Einem Lysat wurde anstatt anti-PLC γ -Antikörper, Präimmunserum (Kaninchen) zugegeben. Wie in Abbildung 3.11. dargestellt, konnten in Immunpräzipitaten der PLC γ kopräzipitierende G α_i -Proteine nachgewiesen werden. Nach Stimulation mit PDGF (Spur 3) kam es zu einer deutlichen Zunahme dieses PTX-Substrates im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen (Spur 2).

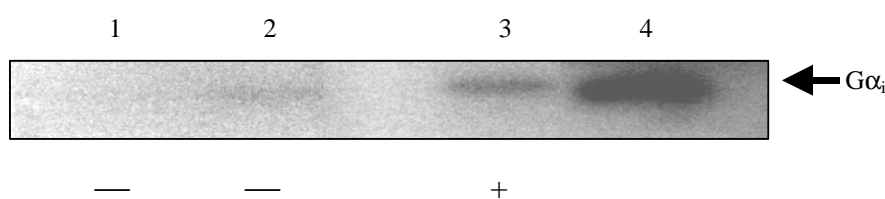


Abb. 3.11.: Koimmunpräzipitation von PLC γ und G α_i -Proteinen aus humanen Hautfibroblasten

Humane Hautfibroblasten wurden ohne (—, Spur 1, 2) oder mit (+, Spur 3) PDGF (50 ng/ml) 8 min lang bei 37°C inkubiert und zu Lysaten aufgearbeitet. Aus den Lysaten (1 mg) wurde mit anti-PLC γ -Antikörper (Spuren 2, 3) bzw. Präimmunserum (Spur 1) immunpräzipitiert. Als Positivkontrolle wurden Sf9-Zellmembranen (Spur 4) mitgeführt. Die Proben wurden anschließend *in vitro* ADP-ribosyliert. Dargestellt ist ein Autoradiogramm mit [32 P]ADP-Ribose markierten G α_i -Proteinen (Pfeil). Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Die in Spur 4 mitgeführte Positivkontrolle zeigte erwartungsgemäß eine intensive Markierung von G α_{i2} -Proteinen. Für den Präzipitationsansatz mit Präimmunserum (Spur 1) konnte kein Signal beobachtet werden.

Dieses Ergebnis bestätigt, daß in humanen Hautfibroblasten G α_i -Proteine mit der PLC γ interagieren. Eine Aktivierung des PDGF-Rezeptors durch PDGF führt dann zu einer Zunahme der Menge von G α_i -Proteinen, die mit der PLC γ assoziiert sind.

Zusammengefaßt unterstützen diese Experimente die Hypothese, daß es nach Stimulation mit PDGF zur vorübergehenden Ausbildung eines Multiproteinkomplexes aus PDGF-Rezeptor, G-Proteinen und PLC γ kommt. Wie die wechselseitige Bindung dabei aussieht, und ob hierbei u.U. Adapterproteine beteiligt sind, kann aus diesen Experimenten jedoch noch nicht abgeleitet werden.

3.3. Effekt einer PTX-Behandlung auf die durch PDGF stimulierte Chemotaxis

Die vorangegangenen Untersuchungen befaßten sich mit Signaltransduktionsvorgängen in humanen Hautfibroblasten, die sich innerhalb eines Zeitraumes von ~10 min nach Stimulation der Zellen durch PDGF ereignen. In einer anschließenden Versuchsreihe wurde untersucht, ob die Interaktion von PDGF-Rezeptor mit G_i -Proteinen auch eine (funktionelle) Relevanz für nachfolgende grundlegende physiologische Prozesse der Zelle besitzt. Zu einem solchen Ereignis gehört die gerichtete Wanderung der Zellen zum Ort eines Stimulus, die Chemotaxis. Zunächst wurde die Wirkung von PDGF auf die Chemotaxis von humanen Hautfibroblasten untersucht. Hierzu wurden die Zellen 24 h lang mit PDGF (20 ng/ml) oder zur Kontrolle nur mit Medium in einer sogenannten Mikrochemotaxis-Kammer bei 37 °C stimuliert. Die Quantifizierung der migrierenden Zellen erfolgte durch Auszählung unter dem Mikroskop bei geeigneter Vergrößerung. Nachdem nachgewiesen werden konnte, daß die Stimulation der Zellen mit PDGF zu einem Anstieg der Chemotaxis führte, wurde daraufhin der Effekt von PTX auf die durch PDGF stimulierte Chemotaxis vergleichend analysiert. In Abbildung 3.12. ist das Ergebnis dieser Untersuchungen wiedergegeben.

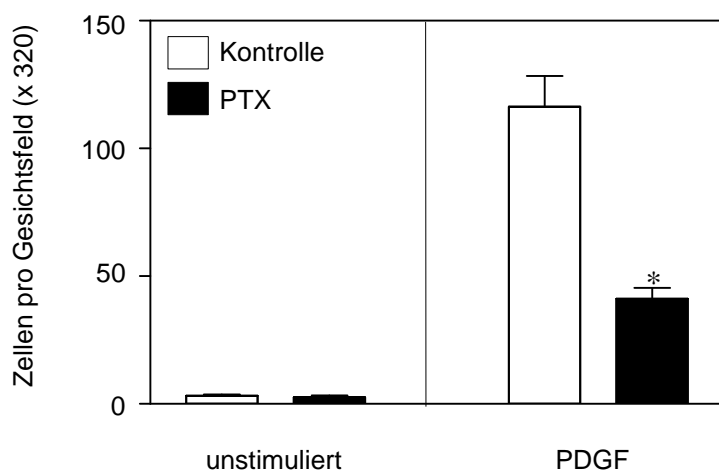


Abb. 3.12.: Effekt von PTX auf die durch PDGF stimulierte Chemotaxis in humanen Hautfibroblasten

Die Migration humaner Hautfibroblasten wurde in einer Mikrochemotaxis-Kammer untersucht. Die Zellen wurden 24 h lang mit PDGF (20 ng/ml) stimuliert bzw. blieben unstimuliert. Die Hälfte der Experimente wurde in Anwesenheit von PTX (100 ng/ml) durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. migrierter Zellen pro Gesichtsfeld (x 320). Jeweils 6 Brunnen einer Kammer wurden für die jeweilige Inkubationsbedingung verwendet. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente. * bedeutet signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) zu Zellen ohne PTX-Behandlung (Kontrolle).

Wie aus der Abbildung 3.12. ersichtlich wird, wanderten in Abwesenheit von PDGF einige wenige Zellen durch die Filtermembran. Eine Behandlung mit PTX hatte auf diese basale Migration keinen Effekt. Nach Stimulation der Zellen mit PDGF kam es zu einer $36 \pm 3,5$ -

fachen Zunahme der Zahl migrierter Zellen. In Anwesenheit von PTX wurde ebenfalls eine durch PDGF stimulierte Migration der Hautfibroblasten beobachtet, jedoch entsprach das Ausmaß dieser Migration nur noch einem Wert von $45 \pm 4.5 \%$ ($p < 0,05$) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen.

Diese Ergebnisse belegen, daß die Interaktion von PDGF-Rezeptor und G_i -Proteinen auch eine funktionelle Konsequenz für Zellantworten wie die Chemotaxis besitzt, die am Ende der Signalkaskade stattfinden.

3.4. Effekt einer PTX-Behandlung auf die durch PDGF stimulierte DNA-Synthese

Neben der Migration ist die Proliferation eine weitere wichtige Eigenschaft von Fibroblasten, die durch Wachstumsfaktoren wie PDGF ausgelöst werden kann. Wie die Migration, gehört die Proliferation auch zu den Effekten, die am Ende einer Signalkaskade beobachtet wird. Daher wurde untersucht, ob eine Behandlung mit PTX einen Einfluß auf die durch PDGF stimulierte Zellproliferation - hier gemessen durch die Quantifizierung der DNA Synthese - hat.

Hierzu wurden humane Hautfibroblasten 24 h lang in serumreduzierten Medium kultiviert, anschließend wurde die DNA-Synthese nach Stimulation der Zellen über den Einbau von [^3H]-Thymidin quantifiziert.

Zunächst wurde die DNA-Synthese nach Stimulation der Zellen mit PDGF (20 ng/ml) oder FBS (10 %) untersucht. In Abbildung 3.13. ist das Ergebnis dieser Untersuchung dargestellt. Erwartungsgemäß konnte nach Stimulation mit PDGF (4848 ± 361 cpm) und FBS (2872 ± 677 cpm) eine deutliche Zunahme der DNA-Synthese im Vergleich zu unstimulierten Zellen (966 ± 44 cpm) gemessen werden.

Eine Vorbehandlung der Zellen mit PTX (100 ng/ml) führte zu einer signifikanten Abnahme der durch PDGF (2138 ± 111 cpm, $p < 0,05$) und durch FBS (846 ± 126 , $p < 0,05$) stimulierten DNA-Synthese im Vergleich zu nicht vorbehandelten Zellen. Daneben konnte bereits auf die basale DNA-Synthese von unstimulierten Zellen ein leichter Effekt durch die PTX-Vorbehandlung beobachtet werden.

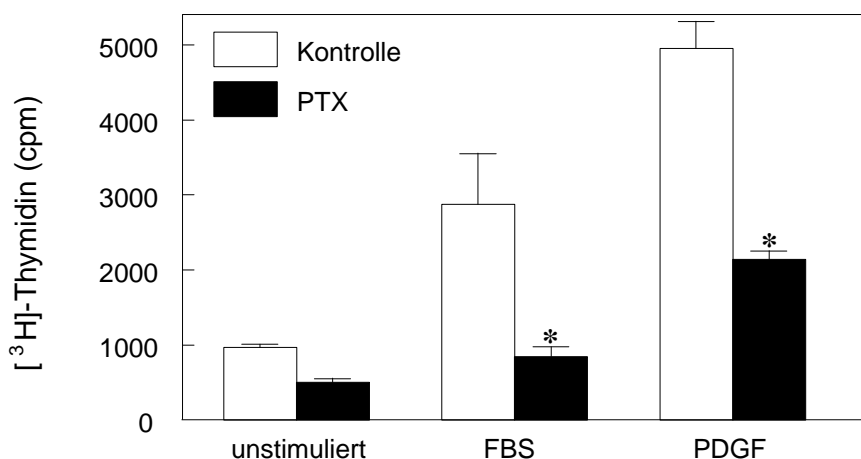


Abb. 3.13: Einfluß von PTX auf die durch PDGF stimulierte DNA-Synthese in humanen Hautfibroblasten

Humane Hautfibroblasten wurden mit PDGF (20 ng/ml), FBS (10 %) stimuliert oder blieben unstimuliert. Anschließend wurde die DNA-Synthese durch Messung des Einbaus von [^3H]-Thymidin in die Zellen bestimmt. Um den Einfluß von PTX zu untersuchen, wurden die Zellen vor Stimulation 16 h lang mit PTX (100 ng/ml) vorbehandelt. Die Messung wurde in Triplikaten durchgeführt, dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm S.E.M. Die Ergebnisse sind repräsentativ für eine Reihe von 3 unabhängigen Experimenten. * bedeutet signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) zu Zellen ohne PTX-Behandlung (Kontrolle).

Auch diese Ergebnisse belegen, wie im Falle der Chemotaxis, daß PTX-sensitive G-Proteine eine wichtige Rolle bei durch PDGF stimulierten Zellantworten von humanen Hautfibroblasten spielen. Ihre Beteiligung wirkt sich dabei nicht nur auf frühe Signale der Signaltransduktionskaskade aus, sondern hat entscheidenden Einfluß auch auf physiologisch relevante Zellantworten.

3.5. Die Bedeutung der Gb3-Variante Gb3s am Beispiel der Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade

Die durch PTX-katalysierte ADP-Ribosylierung von heterotrimeren G-Proteinen setzt das Vorliegen des G-Proteins im inaktiven heterotrimeren $\text{G}\alpha^*\text{GDP}$ -Zustand, d.h. in Assoziation mit $\text{G}\beta\gamma$ -Untereinheiten voraus. So ist der Nachweis der durch $\text{G}\beta\gamma$ -vermittelten und durch PTX-katalysierten ADP-Ribosylierung von $\text{G}\alpha_i$ -Untereinheiten ein Test für die biologische Aktivität von $\text{G}\beta\gamma$ -Dimeren. Nur unter ganz extremen Bedingungen gelingt es, freie $\text{G}\alpha_i$ -Proteine durch PTX zu modifizieren. Daher lag es nahe zu vermuten, daß es sich bei der Assoziation von $\text{G}\alpha_i$ mit dem PDGF-Rezeptor, die streng genommen nur für die $\text{G}\alpha$ -Untereinheit gezeigt wurde, um die Assoziation eines Heterotrimers mit dem Rezeptor handelt. Ziel der weiteren Untersuchungen war es daher, auch die Assoziation des PDGF-Rezeptors mit dem $\text{G}\beta$ -Protein nachzuweisen ($\text{G}\beta$ -Proteine können sich in der Zelle nur falten, wenn sie einen - physiologisch nicht mehr trennbaren - Komplex mit einem $\text{G}\gamma$ -

Protein eingehen, d.h. der Nachweis des G β -Proteins bestätigt dann auch die Anwesenheit einer G γ -Untereinheit).

Wie bereits ausgeführt, hatten Untersuchungen der Arbeitsgruppe Siffert ergeben, daß Hautfibroblasten von Patienten mit essentieller Hypertonie eine genetisch fixierte Steigerung ihrer Signaltransduktion über PTX-sensitive G-Proteine aufweisen. Als primäre Ursache wurde dabei eine Mutation in einer Untereinheit PTX-sensitiver G-Proteine postuliert (Pietruck et al., 1996). Interessanterweise wurden dabei auch gesteigerte Signale nach Stimulation mit PDGF gefunden - eine Initialbeobachtung, die den Auslöser der hier vorgestellten Arbeit bildete.

Auf der Suche nach der postulierten Mutation identifizierte die Arbeitsgruppe Siffert parallel zu den hier vorgestellten Untersuchungen zur Assoziation des PDGF-Rezeptors mit G α_i -Proteinen einen Polymorphismus im Gen der G-Proteinuntereinheit G β_3 (C825T; Siffert et al., 1998). Das 825T-Allel kommt bei Patienten mit Hypertonie gehäuft vor, und es ist mit dem Auftreten einer alternativen Spleißvariante von G β_3 , die mit G β_3s bezeichnet wird, verknüpft. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, daß G β_3s für die gesteigerte Signaltransduktion in Fibroblasten von Hypertonikern verantwortlich ist (Iiri et al., 1998).

Daraus ergab sich die Vermutung, daß G β_3s auch für die gesteigerten PDGF-Signale in Zellen von Patienten mit Hypertonie verantwortlich sein könnte. Daher sollte untersucht werden, ob zusammen mit G α_i auch G β -Proteine - und dabei natürlich G β_3 und G β_3s - mit dem PDGF-Rezeptor interagieren können.

Bis zu diesem Zeitpunkt war von G β_3s nur die Sequenz bekannt und erste biochemische Hinweise legten nahe, daß es in Anwesenheit von geeigneten G $\beta_3\gamma$ -Dimeren möglich ist, einen G α^* GDP/GTP Austausch durch Stimulation mit Mastoparan - einem direkten Aktivator von G α_i -Proteinen - auszulösen (Siffert et al., 1998). G β_3s fehlt wie bereits dargestellt das Äquivalent einer WD-Domäne (siehe 1.5.). Daher stellte sich die Frage, ob G β_3s trotz dieser bedeutenden Deletion die typischen biochemischen Charakteristika von G β -Proteinen erfüllt. Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es daher Belege zu sammeln, daß G β_3s biologisch aktiv ist, um dann in weiteren Untersuchungen herauszufinden, ob G β_3 und G β_3s mit dem PDGF-Rezeptor tatsächlich in Wechselwirkung treten können.

Eine wichtige Funktion freier G $\beta\gamma$ -Dimere ist die Stimulation der MAP-Kinase-Kaskade (Della Roca et al., 1997). Zur Untersuchung, ob G $\beta\gamma$ -Dimere, die G β_3 bzw. G β_3s enthalten,

die MAP-Kinase aktivieren können, wurden daher G β -Untereinheiten in Kombination mit verschiedenen G γ -Proteinen in COS-7- bzw. HEK-293tsa-Zellen exprimiert und die Aktivierung einer koexprimierten HA-markierten MAP-Kinase (HA-ERK1) in einem *in vitro* Immunkomplex-Kinase-Assay untersucht. Hierbei handelt es sich um eine Standardmethode zur Messung der MAP-Kinase-Aktivität. Die Einführung des HA-Epitops beeinflusst die Eigenschaften der MAP-Kinase in diesem System nicht (Meloche et al., 1992).

Im Vorfeld wurde eine Reihe von Versuchen durchgeführt, in denen die einzelne Parameter für unser System optimiert wurden.

3.5.1. Etablierung des *in vitro* Immunkomplex-Kinase-Assays

Zunächst wurden in Westernblot-Analysen die Bedingungen für eine Immunpräzipitation von HA-ERK1 aus COS-7-Zellysaten untersucht. Immunpräzipitation und Immunoblot wurden mit einem sehr spezifischen Antikörper, der gegen die HA-Markierung gerichtet ist - anti-HA-Antikörper (Klon 12CA5) - durchgeführt. Die Immunpräzipitation von HA-ERK1 aus Lysaten von COS-7-Zellen, die zuvor mit HA-erk1 transfiziert worden waren, konnte im Immunoblot nachgewiesen werden. Im Präzipitat konnte eine Proteinbande von ~46 kDa detektiert werden, die mit der von Meloche et al. (1992) publizierten Größe für HA-ERK1 übereinstimmte. Die Spezifität der Immunpräzipitation wurde durch die Verwendung von Präimmunserum (Maus) in der Präzipitation - anstatt des anti-HA-Antikörpers - bestätigt, hier konnte kein HA-ERK1-Signal im Westernblot nachgewiesen werden. Die Bedingungen unter denen diese Immunpräzipitation durchgeführt wurde, wurden für die nachfolgenden *in vitro* Immunkomplex-Kinase-Assays übernommen (siehe auch 2.2.10.).

Als Maß für die HA-ERK1-Aktivierung im *in vitro* Immunkomplex-Kinase-Assay dient die Phosphorylierung des MAP-Kinase-Substrats MBP (~18 kDa) durch HA-ERK1-Präzipitate. Daher wurde in einem weiteren Vorversuch die optimale Dauer für die Phosphorylierungsreaktion, in der die HA-ERK1-Präzipitate mit [γ -³²P]ATP und MBP inkubiert werden, untersucht. Zunächst wurden COS-7-Zellen mit HA-erk1 transfiziert. Die in serumfreien Medium (24 h) kultivierten Zellen wurden vor der Lyse mit EGF stimuliert (100 ng/ml, 1min) bzw. blieben unbehandelt. EGF ist ein starker Stimulator der MAP-Kinase von COS-7 Zellen (van Biesen et al., 1995).

Von jeder Zellysatpräparation wurden Doppelansätze mit dem anti-HA-Antikörper präzipitiert. Anschließend wurde das eine Immunpräzipitat 15 min und das andere 30 min lang

mit [γ - 32 P]ATP und MBP bei RT inkubiert. Als Kontrolle dienten Lysate unstimulierter Zellen (0 min Inkubationsdauer). Zur Kontrolle der Spezifität der Reaktionen wurde Zellysat (unstimuliert) ohne MBP und MBP ohne Lysat untersucht.

Die Proteine wurden dann in einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Von diesem Gel wurde ein Autoradiogramm angefertigt (Abb. 3.14.) und [γ - 32 P]-markiertes MBP mittels PhosphoImaging-System quantifiziert (Abb. 3.15.).

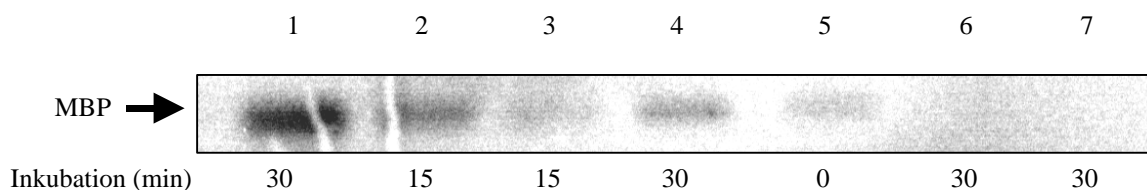


Abb. 3.14.: Einfluß der Inkubationsdauer auf die Phosphorylierung von MBP

Dargestellt ist die Phosphorylierung von MBP durch immunpräzipitiertes HA-ERK1 im Autoradiogramm. COS-7-Zellen wurden mit HA-erk1 (0,2 µg/35 mm Schale, Spuren 1 - 6) transfiziert. Vor der Lyse wurden die Zellen mit EGF (100 ng/ml) 1 min lang inkubiert (Spur 1, 2) oder blieben unbehandelt (Spuren 3 - 6). Anschließend erfolgte die Immunpräzipitation mit anti-HA-Antikörper. Die Präzipitate wurden für die beschriebenen Zeiten mit MBP und [γ - 32 P]ATP bei RT inkubiert. Als Kontrollen wurden ein unstimuliertes Lysat ohne MBP (Spur 6) und MBP ohne Lysat (Spur 7) mitgeführt.

Wie aus Abbildung 3.15. deutlich wird, konnte die starke Stimulation der MAP-Kinase durch EGF bestätigt werden. Nach Stimulation mit EGF und auch in unstimulierten Kontrollen konnte eine zeitabhängige Zunahme der MBP-Phosphorylierung beobachtet werden. Eine Verlängerung der Phosphorylierungsreaktion von 15 min auf 30 min ergab für unstimulierte (Spur 3 und 4 der Abb. 3.14.) und durch EGF stimulierte Zellen (Spur 2 und 1 der Abb. 3.14.) nahezu eine Verdopplung der radioaktiven Phosphorylierung von MBP. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde in allen folgenden MAP-Kinase-Aktivitätsmessungen eine 30 min lange Inkubation mit [γ - 32 P]ATP durchgeführt.

Erwartungsgemäß konnte in der Kontrolle Lysat ohne MBP (Spur 6 der Abb. 3.14.) kein phosphoryliertes Protein, das zufällig auf der Höhe von MBP verläuft, detektiert werden. Weiterhin zeigte die Kontrolle MBP ohne Lysat (Spur 7 der Abb. 3.14.) keine quantifizierbare Phosphorylierung von MBP in Abwesenheit von Lysat, folglich war es zu keiner Autokatalyse des MBP gekommen.

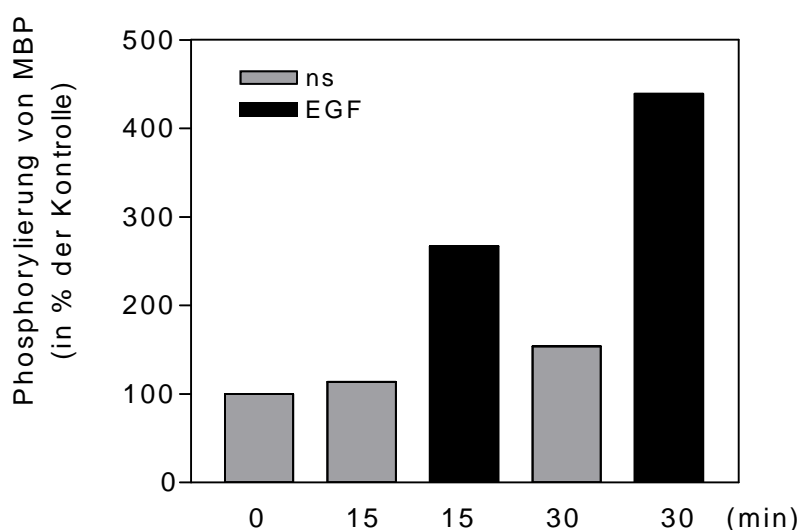


Abb. 3.15.: Einfluß der Inkubationsdauer auf die Phosphorylierung von MBP

Einfluß der Inkubationsdauer auf den Einbau von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ in MBP durch immunpräzipitiertes HA-ERK1. Die Quantifizierung erfolgte mittels PhosphoImaging-System. Die Ergebnisse sind in Prozent der Kontrolle (=100 %, unstimulierte Zellen zum Zeitpunkt 0 min) angegeben. (ns = nicht stimulierte Zellen)

Weitere Kontrollexperimente mit Lysaten von COS-7 Zellen die entweder mit EGF (100 ng/ml, 1 min) oder LPA (10 μM , 5 min), einem weiteren starken Aktivator der MAP-Kinase (Luttrell et al., 1995), behandelt worden waren, zeigten, daß nur nach Transfektion von HA-erk1 signifikante Aktivitäten an MAP-Kinase präzipitiert werden konnten. Das bedeutet, daß durch den hier vorgestellten Assay nur die Epitop-markierte MAP-Kinase, nicht aber die endogene MAP-Kinase der COS-7 Zellen, erfaßt wird.

3.5.2. Einfluß von G β 3 und G β 3s auf die MAP-Kinase-Aktivität

Zur Untersuchung des Einflusses von G β 3 bzw. G β 3s auf die MAP-Kinase-Kaskade wurden die entsprechenden G β -Proteine in Kombination mit verschiedenen G γ -Proteinen in Zellen exprimiert und die Aktivität von koexprimierten HA-ERK1 in dem *in vitro* Immunkomplex-Kinase-Assay gemessen. Diese Untersuchungen wurden vergleichend an COS-7- und HEK-293tsa-Zellen durchgeführt. Bei beiden handelt es sich um Zelllinien, die mehrere endogene G α_i - und G γ -Isoformen exprimieren, aber in denen keine G β 3- bzw. G β 3s-Proteine durch Westernblot-Analysen detektiert werden konnten.

Als Positivkontrolle wurden mit EGF stimulierte Zellen verwendet. Die Ergebnisse der verschiedenen G β 3 γ - bzw. G β 3s γ -Dimere wurden mit den Resultaten von G β 1 und G β 1 γ 2 verglichen, für die bereits in der Literatur eine Stimulation der MAP-Kinase-Kaskade gezeigt werden konnte (Hawes et al., 1995).

In den folgenden Abbildungen sind jeweils repräsentative Autoradiogramme einer Serie von unabhängigen ($n = 3 - 6$) *in vitro* Immunkomplex-Kinase-Assays für COS-7- (Abb. 3.16.) und HEK-293tsa-Zellen (Abb. 3.17.) wiedergegeben.

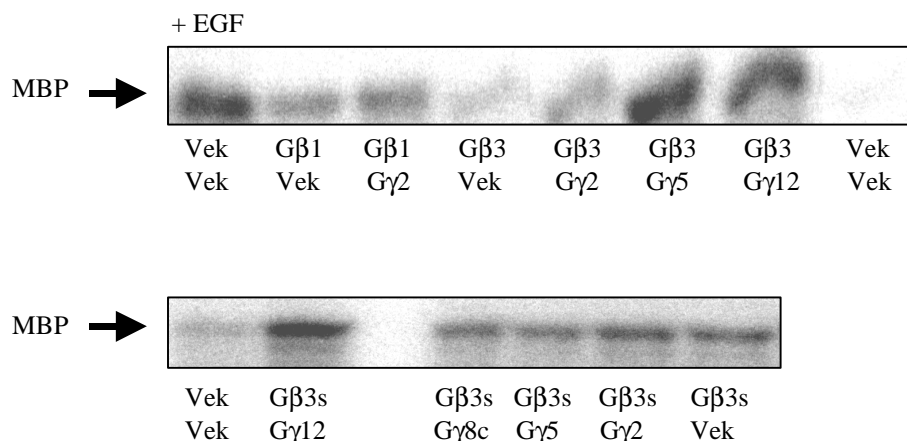


Abb. 3.16.: Effekt von Gβ3 und Gβ3s auf die MAP-Kinase-Aktivität (HA-ERK1) in COS-7-Zellen

COS-7-Zellen wurden mit HA-erk1 (0,2 µg/35 mm Schale) und den angegebenen Gβ- und Gγ-Untereinheiten oder dem leeren Vektor (Kontrolle) kotransfiziert. Die DNA-Konzentration wurde durch Vektorausgleich (Vek) konstant auf 2,2µg gehalten. Als Positivkontrolle dienten Kontrollzellen, die 1 min lang mit EGF (100 ng/ ml) stimuliert worden waren. Dargestellt ist die Phosphorylierung des MBP (Pfeil) durch immunpräzipitiertes HA-ERK1 nach einem *in vitro* Immunkomplex-Kinase-Assay im Autoradiogramm.

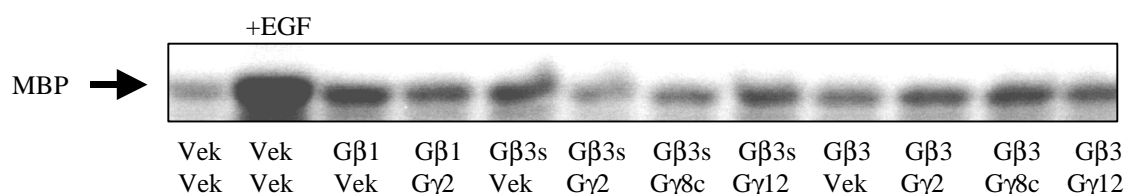


Abb. 3.17.: Effekt von Gβ3 und Gβ3s auf die MAP-Kinase-Aktivität (HA-ERK1) in HEK-293tsa-Zellen

HEK-293tsa-Zellen wurden mit HA-erk1 (0,2 µg/35 mm Schale) und den angegebenen Gβ- und Gγ-Untereinheiten oder dem leeren Vektor (Kontrolle) kotransfiziert. Die DNA-Konzentration wurde durch Vektorausgleich (Vek) konstant auf 2,2µg gehalten. Als Positivkontrolle dienten Kontrollzellen, die 1 min lang mit EGF (100 ng/ ml) stimuliert worden waren. Dargestellt ist die Phosphorylierung des MBP (Pfeil) durch immunpräzipitiertes HA-ERK1 nach einem *in vitro* Immunkomplex-Kinase-Assay im Autoradiogramm.

In Abbildung 3.18. sind die Ergebnisse nach Quantifizierung von [γ - 32 P]-markiertem MBP in Prozent über der Kontrolle aus diesen Experimenten ($n = 3 - 6$) zusammenfassend dargestellt. Bei der Kontrolle handelte es sich um unstimulierte Zellen, die nur mit HA-erk1 und dem leeren Vektor transfiziert worden waren.

Wie bereits aus den Autoradiogrammen (Abb. 3.16. und 3.17.) deutlich wird, führte die Stimulation der Zellen mit EGF zu einer starken MAP-Kinase-Aktivierung ($337,5 \pm 13,5$ % über Kontrolle). Weiterhin konnte durch die Expression von Gβ1 bzw. Gβ1γ2, die in der Literatur beschriebene Stimulation der MAP-Kinase, reproduziert werden (224 ± 60 % bzw.

158 ± 27 % über Kontrolle). Die Expression von Gβγ-Dimeren, bestehend aus Gβ3 und Gγ2, Gγ8c oder Gγ12 führte zu einem deutlichen Anstieg der HA-ERK1-Aktivitäten zwischen 111 - 169 % über der Kontrolle. Für Gβ3γ5 konnte ebenfalls eine Stimulation gemessen werden (391 % über Kontrolle). Aber nicht nur Gβ3γ-Dimere waren in der Lage die MAP-Kinase zu stimulieren, sondern auch Gβ3s-Dimere, die die Variante Gβ3s enthielten. Die Expression von Gβ3s mit Gγ2, Gγ5, Gγ8c oder Gγ12 führte zu einer deutlichen MAP-Kinase-Aktivierung zwischen 36 - 150,5 % über der Kontrolle.

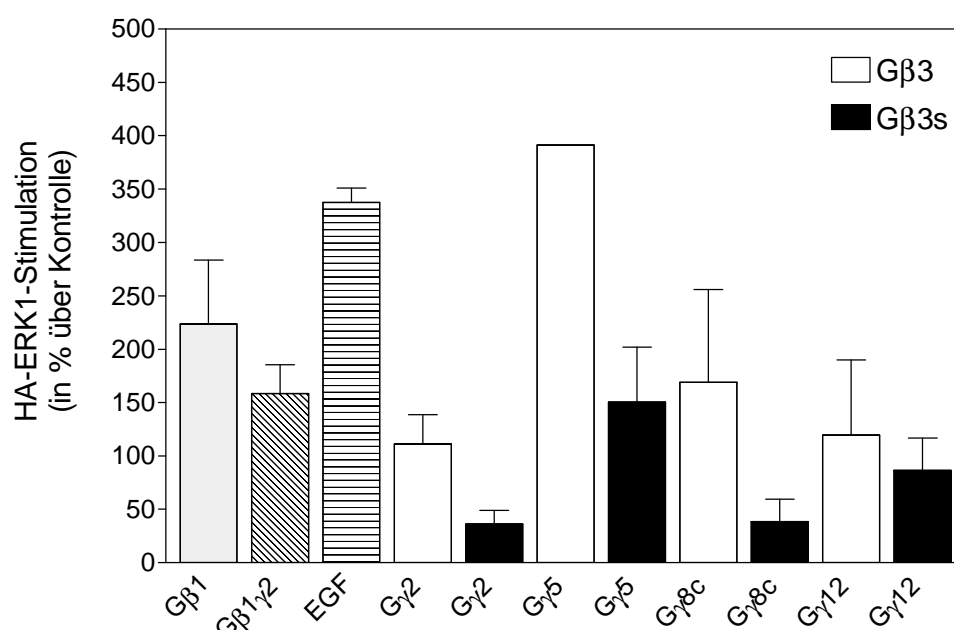


Abb. 3.18.: Stimulation HA-ERK1-Aktivität durch verschiedene Gβγ-Dimere in COS-7 und HEK-293tsa-Zellen
Dargestellt ist das Ergebnis der Quantifizierung von [γ - 32 P]-markiertem MBP als Maß für die HA-ERK1-Stimulation. Die Ergebnisse sind in Prozent über Kontrollzellen ± S.E.M. (n = 3 - 6) angegeben.

Vergleicht man die Ergebnisse der untersuchten Gβ3γ- und Gβ3sγ-Dimere miteinander, so fällt ein Trend zu einer höheren Aktivität für Gβ3γ-Dimere im Vergleich zu den untersuchten Gβ3sγ-Dimeren auf (siehe Abb. 3.18.), dieser Trend erreichte jedoch keine Signifikanz. Quantifizierungen aus den Autoradiogrammen weisen einen beträchtlichen Schwankungsbereich auf. Somit ist an dieser Stelle zwar eindeutig gezeigt, daß alle untersuchten Gβ3γ- und Gβ3sγ-Dimere signifikant ($p < 0,05$) die MAP-Kinase-Kaskade aktivieren können, die Frage, ob Gβ3 in diesem System stärker aktiv ist als Gβ3s, muß allerdings noch offen bleiben.

Als wichtigstes Ergebnis ist an dieser Stelle festzuhalten, daß Gβ3s trotz der großen strukturellen Änderung durch Fehlen einer WD-Domäne biologische aktiv - zumindest was die Aktivierung der MAP-Kinase angeht - ist.

Wie bereits erläutert, muß man bei den hier beschriebenen Experimenten mechanistisch davon ausgehen, daß eine Überexpression freier Gβγ-Dimere die MAP-Kinase-Kaskade aktivieren kann. Mittlerweile wurden 13 verschiedene Gγ-Untereinheiten beschrieben. Aufgrund dieser großen Vielfalt an möglichen Gβγ-Kombinationen war es nicht möglich, diese jeweils alle im Detail zu untersuchen. Die Dimerisierung von Gβ-Proteinen mit Gγ-Untereinheiten ist ein komplexer Prozeß bei dem u.a. Chaperone beteiligt sind (Clapham und Neer, 1997). Gβ-Proteine, die keinen Partner finden werden, sind nicht stabil und werden abgebaut. Die Überexpression eines spezifischen Gβ-Proteins führt daher dazu, daß Gβγ-Dimere des überexprimierten Gβ-Proteins in der Zelle zu ungunsten endogener Gβ-Proteine überwiegen. Wir stellten daher die Hypothese auf, daß die alleinige Überexpression von Gβ3 und Gβ3s dazu führt, daß die entsprechenden Zellen eine überwiegende Zahl von Gβγ-Dimeren aus Gβ3 bzw. Gβ3s und endogenen Gγs enthalten werden.

In weiteren MAP-Kinase-Messungen wurde daher untersucht, welchen Effekt die alleinige Expression von Gβ3 bzw. Gβ3s auf die Aktivität einer koexprimierten HA-ERK1 in den betreffenden Zelllinien hat. In Abbildung 3.19. ist das Ergebnis dieser Untersuchungen (n = 3-6) quantitativ dargestellt.

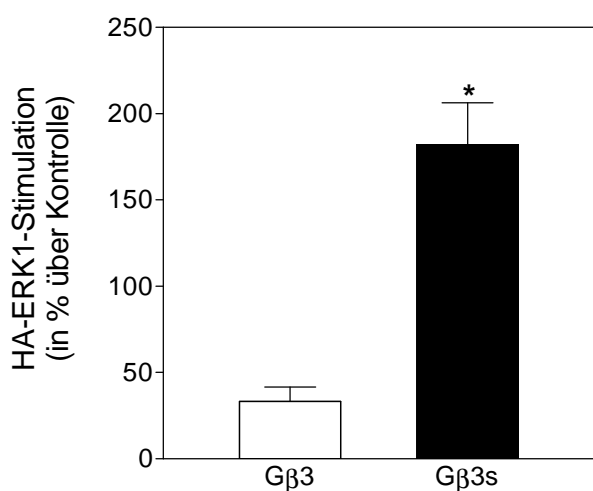


Abb. 3.19.: Stimulation der HA-ERK1-Aktivität nach Expression von Gβ3 bzw. Gβ3s in Cos-7- und HEK-293tsa-Zellen

Dargestellt ist das Ergebnis der Quantifizierung von [γ - 32 P]-markiertem MBP als Maß für die HA-ERK1-Stimulation. Die Ergebnisse sind in Prozent über Kontrollzellen \pm S.E.M. angegeben. * bedeutet signifikant unterschiedlich zu Gβ3 exprimierenden Zellen mit $p < 0,05$, (n = 3 - 6). (Kontrollzellen: nur mit HA-erk1 und dem leeren Vektor transfiziert)

Dieses Ergebnis zeigt, daß die MAP-Kinase-Kaskade bereits durch Gβ3s alleine effizient stimuliert wurde. Die Stimulation der MAP-Kinase-Kaskade durch Gβ3s (182 ± 24 % über

Kontrolle) war darüberhinaus signifikant stärker als die durch Gβ3 ($33 \pm 8\%$ über Kontrolle, $p < 0,05$).

In den vorangegangenen Experimenten konnte eher ein Trend zur stärkeren Stimulation der MAP-Kinase durch Gβ3γ-Dimere im Vergleich zu Gβ3sγ-Dimeren beobachtet werden (siehe Abb. 3.18.). Bei alleiniger Expression von Gβ3 bzw. Gβ3s verschiebt sich dieser Trend aber zugunsten von Gβ3s (Abb. 3.19.). Dies läßt sich möglicherweise dadurch erklären, daß Gβ3s *in vivo* mit geeigneteren, endogenen γ-Untereinheiten dimerisiert, als wenn bestimmte γ-Proteine, wie in den Eingangsexperimenten, überexprimiert werden.

Zusammengefaßt konnte durch diese Untersuchungen die biologische Funktionalität von Gβ3s am Beispiel der MAP-Kinase belegt werden. Interessanterweise führte Gβ3s unter den experimentellen Bedingungen sogar zu einer stärkeren Stimulation der MAP-Kinase als das Wildtyp-Protein Gβ3.

3.6. Nachweis einer Interaktion von PDGF-Rezeptor und HA-markierten Gb-Proteinen

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte die biologische Funktionsfähigkeit von Gβ3s gezeigt werden. In weiterführenden Untersuchungen sollte nun - wie bereits ausgeführt - eine mögliche Beteiligung von Gβ3 bzw. Gβ3s an der PTX-sensitiven Signaltransduktion nach Stimulation mit PDGF geprüft werden. Eine direkte Nachweismöglichkeit stellt die Koimmunpräzipitation von PDGF-Rezeptor und Gβ3-Proteinen dar. Da zur Detektion von Gβ3-Proteinen keine spezifischen Antikörper kommerziell verfügbar sind, wurden in diesen Experimenten HA-markierte Gβ-Proteine verwendet.

3.6.1. HA-Epitop-Markierung von Gb-Proteinen

Zum Nachweis möglicher Interaktionen von Gβ-Untereinheiten mit dem PDGF-Rezeptor wurden Gβ1, Gβ3 und Gβ3s N-terminal mit einer HA-Markierung versehen (siehe 2.2.2.). Geeignete kommerzielle Antikörper für nicht markierte Gβ3-Proteine standen nicht zur Verfügung. Für die HA-Markierung wurde den entsprechenden Gβ-DNA-Sequenzen mittels PCR-Mutagenese das HA-Epitop angefügt. Nach Einklonierung dieser Sequenzen in den Expressionsvektor pcDNA3.1 und anschließender Transformation von kompetenten *E.coli*-

Bakterien (JM 109) konnten in einer Klon-PCR positive Bakterienklone identifiziert werden. Schließlich wurde die präparierte Plasmid-DNA durch DNA-Sequenzierung verifiziert. Die HA-markierten G β -DNA-Sequenzen wurden dann für die transiente Transfektion von HEK-293tsa- und CHOwt-Zellen verwendet.

3.6.2. Nachweis von HA-markierten G β -Proteinen im Westernblot

Zum Nachweis der Expression der HA-markierten G β -Proteine im Westernblot wurden HEK-293tsa-Zellen mit HA-G β 1, HA-G β 3, HA-G β 3s oder dem leeren Expressionsvektor transfiziert und anschließend zu Ganzzelllysaten aufgearbeitet. Die Zellysate (80 μ g pro Spur) wurden dann in einem 8 - 20 %igen SDS-Gradientengel elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine auf Nitrozellulosemembran transferiert. Zum Nachweis der HA-markierten G β -Proteine wurde der anti-HA-Antikörper verwendet, der spezifisch gegen die HA-Sequenz gerichtet ist (siehe Abb. 3.20.). In Lysaten von Zellen, die mit den unterschiedlichen HA-G β -Konstrukten transfiziert worden waren, konnte jeweils eine spezifische Bande detektiert werden (Spur 2 - 4). Durch Vergleich mit dem Molekulargewichtsstandard konnten HA-G β 1 und HA-G β 3 bei ~38 kDa und HA-G β 3s bei ~34 kDa identifiziert werden. Dieses Ergebnis entspricht den erwarteten M_r der HA-markierten G β -Proteine, die sich aus der M_r des jeweiligen G β -Proteins und der M_r des HA-Epitops (~2 kDa) ergibt. In HEK-293tsa-Zellen, die nur mit dem leeren Vektor transfiziert worden waren, wurde erwartungsgemäß kein Signal beobachtet.



Abb. 3.20.: Nachweis von HA-markierten G β -Proteinen in HEK-293tsa-Zellen

HEK-293tsa-Zellen wurden mit dem leeren Vektor (Spur 1) bzw. HA-G β 1 (Spur 2), HA-G β 3s (Spur 3) oder HA-G β 3 (Spur 4) transfiziert und anschließend zu Ganzzelllysaten aufgearbeitet. Der Nachweis der HA-markierten G β -Proteine im Westernblot erfolgte mit anti-HA-Antikörper. Am rechten Seitenrand sind die Molekulargewichtsstandards in kDa angegeben.

Wir haben die Expression der HA-markierten G β -Proteine auch in einer weiteren Zelllinie, den CHOwt-Zellen, kontrolliert und nachweisen können. Diese Linie erschien für spätere Untersuchungen einer Interaktion von G β -Proteinen mit dem PDGF-Rezeptor in Koimmunpräzipitationen besonders geeignet, da diese CHOwt-Zellen mit dem PDGF-Rezeptor stabil transfiziert sind.

3.6.3. Nachweis einer Koimmunpräzipitation von HA-markierten G β -Proteinen und dem PDGF-Rezeptor

Nachdem die Kontrolle der Expression der HA-G β -Proteine in den entsprechenden Zelllinien erfolgt war, wurde nun die direkte Interaktion des PDGF-Rezeptors mit G β -Proteinen in Koimmunpräzipitationsexperimenten untersucht. Hierzu wurden CHOwt-Zellen mit HA-G β 1, HA- β 3, HA-G β 3s oder nur mit dem leeren Expressionsvektor transfiziert und schließlich zu Zellysaten aufgearbeitet. Vor Präparation der Lysate wurden die Zellen 8 min lang mit PDGF (50 ng/ml) stimuliert. Aus diesen Zellysaten wurde der PDGF-Rezeptor mit anti-PDGF-Rezeptor-Antikörper präzipitiert, die gewonnen Immunpräzipitate in einem 8 – 20 %igen SDS-Gradientengel elektrophoretisch aufgetrennt und schließlich auf Nitrozellulosemembran transferiert. Der immunologische Nachweis koimmunpräzipitierter HA-G β -Proteine erfolgte mit dem anti-HA-Antikörper (siehe 2.2.11.). In Abbildung 3.21. ist das Ergebnis dargestellt.

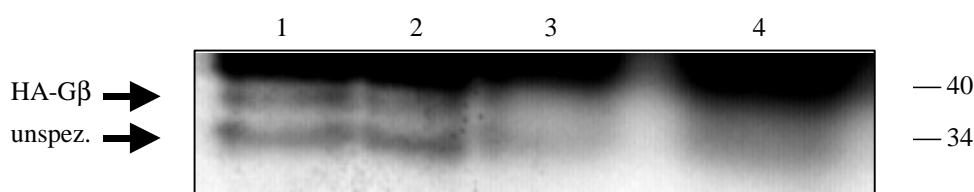


Abb. 3.21.: Nachweis von mit dem PDGF-Rezeptor koimmunpräzipitierten HA-G β -Proteinen in CHOwt-Zellen
CHOwt-Zellen wurden mit HA-G β 3 (Spur 1), HA-G β 1 (Spur 2), HA-G β 3s (Spur 3) oder mit dem leeren Vektor (Spur 4) transfiziert. Die Zellen wurden vor der Lyse 8 min lang mit PDGF (50 ng/ml) bei 37 °C inkubiert. Dargestellt ist der Nachweis von mit dem PDGF-Rezeptor koimmunpräzipitierten HA-G β -Proteinen durch anti-HA-Antikörper im Westernblot. Am rechten Seitenrand sind die Molekulargewichtsstandards in kDa angegeben.

Wir konnten in Zellysaten, die mit HA-G β 3 (Spur 1) bzw. HA-G β 1 (Spur 2) transfiziert worden waren, eine Koimmunpräzipitation der entsprechenden G β -Proteine mit dem aktivierten PDGF-Rezeptor nachweisen. In CHOwt-Zellen, die mit HA-G β 3s transfiziert worden waren, konnte nach der Immunpräzipitation kein Signal im Immunoblot detektiert werden (Spur 3). Wie aus dem vorhergehenden Immunoblot (Abb. 3.20.) hervorgeht, besitzt HA-G β 3s eine M_r von ~34 kDa. HA-G β 3s ist somit etwas kleiner (~ 4 kDa) als HA-G β 3 und HA-G β 1, so daß ein mögliches HA-G β 3s-Signal durch die unspezifische Nebenreaktion in diesem Molekulargewichtsbereich nicht auflösen war und möglicherweise mit der unspezifischen Bande überlagerte. Zellen, die nur mit dem leeren Vektor transfiziert worden waren, zeigten erwartungsgemäß kein Signal.

Somit konnte eine direkte Interaktion von G β 3 bzw. G β 1 mit dem aktiviertem PDGF-Rezeptor nachgewiesen werden, die auf eine Beteiligung dieser G β -Proteine an der Signaltransduktion von PDGF schließen läßt. Zwar weisen die Befunde von Pietruck et al. (1996) auch auf eine Interaktion von G β 3s mit dem PDGF-Rezeptor hin, diese Frage muß jedoch bis zum endgültigen Nachweis offen bleiben.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Beteiligung PTX-sensitiver G-Proteine an der frühen Signaltransduktion von PDGF. Nach den etablierten Konzepten wird davon ausgegangen, daß die initialen Signalübertragungswege von RTK und GPCR unterschiedliche Signalproteine rekrutieren (Letterio et al., 1986). Seit den frühen 90er Jahren mehren sich jedoch Hinweise für eine Beteiligung PTX-sensitiver G-Proteine an der Signaltransduktion von RTK, insbesondere für den EGF-Rezeptor (Yang et al., 1991; 1993; 1994). Für den PDGF-Rezeptor ist dies bislang nur ansatzweise untersucht worden.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war daher die Analyse, ob PTX-sensitive G-Proteine an der Signaltransduktion von PDGF beteiligt sind.

Wir konnten hierzu am Zellkulturmodell primärer humaner Hautfibroblasten folgende Ergebnisse erheben:

- PTX hemmt die durch PDGF stimulierte Aktivierung der PLC γ und damit die intrazelluläre Ca²⁺-Mobilisierung,
- PTX hemmt die durch PDGF induzierte Chemotaxis,
- PTX hemmt die durch PDGF stimulierte Zellproliferation,
- es ist eine direkte Interaktion von PDGF-Rezeptor, G_i-Proteinen und der PLC γ nachweisbar,
- diese Assoziation von G_i-Proteinen mit dem PDGF-Rezeptor und der PLC γ nimmt nach Stimulation mit PDGF zu.

Damit konnte erstmalig gezeigt werden, daß - im Falle von primären Hautfibroblasten - PTX-sensitive G-Proteine mit dem PDGF-Rezeptor interagieren können und insbesondere für die Aktivierung der PLC γ und weiterer zellulärer Effekte von großer Bedeutung sind. Hiermit befaßt sich Kapitel 4.1 der Diskussion.

Viele Untersuchungen zur Signalübertragung von PDGF wurden an permanenten Zelllinien durchgeführt, beispielsweise an Fibroblasten der Ratte (Hasegawa-Sasaki et al., 1988) oder an 3T3-Mausfibroblasten (Letterio et al., 1986). An solchen Zellen wurden bislang keine Effekte von PTX auf die Signalübertragung von PDGF gefunden. Um diesen Widerspruch aufzuklären, wurden die oben beschriebenen Experimente auch auf eine permanente Zelllinie, die NIH3T3-Linie, übertragen. Hierbei konnten wir zwar eine Assoziation von PDGF-Rezeptor und PTX-sensitiven G-Proteinen nachweisen, eine funktionelle Auswirkung auf die

durch PDGF stimulierte Aktivierung der PLC γ fand sich jedoch nicht. Mit diesen Aspekten der zellspezifischen Aktivierung der PLC γ durch PDGF mittels G-Proteinen und möglichen Konsequenzen beschäftigt sich ebenfalls Kapitel 4.1 der Diskussion.

Parallel zu diesen hier beschriebenen Untersuchungen, wurden primäre Hautfibroblasten von unserer Arbeitsgruppe verwendet, um individuelle, genetisch fixierte Unterschiede in der Signalübertragung bei Patienten mit Bluthochdruck im Vergleich zu gesunden Probanden zu untersuchen. Hierbei ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen Gesunden und Hypertoniepatienten hinsichtlich der Amplitude von Ca²⁺-Signalen und der DNA-Synthese nach Stimulation der Hautfibroblasten mit Agonisten, deren Signalübertragung PTX-sensitive G-Proteine mit einschließt (Pietruck et al., 1996). Die verwendeten Agonisten umfaßten u.a. Thrombin, Lysophosphatidsäure, Angiotensin II und Endothelin. Nach Vorbehandlung der Zellen mit PTX waren diese Unterschiede nicht mehr nachweisbar, was als Indiz für eine Beteiligung PTX-sensitiver G-Proteine an der gesteigerten Signalübertragung angesehen wurde (Pietruck et al., 1996). Interessanterweise waren DNA-Synthese und Ca²⁺-Signale nach Stimulation mit PDGF bei den Fibroblasten von Hypertonikern ebenfalls deutlich gesteigert. Auch im Falle von PDGF wurden die Unterschiede in den Signalen zwischen Zellen von Hypertonikern und Gesunden durch eine Vorbehandlung der Zellen mit PTX aufgehoben. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen konnte als wahrscheinliche Ursache der gesteigerten Signalübertragung ein Polymorphismus (T/C-Austausch an Position 825 der cDNA) im Gen der G-Proteinuntereinheit G β 3 (*GNB3*) nachgewiesen werden. Das Vorkommen dieses Polymorphismus ist mit dem Auftreten von alternativen Spleißen von G β 3 assoziiert. Dabei entsteht die G β 3 Variante G β 3s (Siffert et al., 1998).

Da bei den Hautfibroblasten von Hypertonikern - also Trägern des *GNB3* 825T-Allels - die durch PDGF stimulierten Ca²⁺-Signale und Zellproliferation deutlich gesteigert waren, lag die Hypothese nahe, daß G β 3 bzw. G β 3s an den PTX-sensitiven Signalübertragungsvorgängen nach Stimulation mit PDGF beteiligt sind. Es wurde daher zuerst die biologische Funktionsfähigkeit von G β 3s nachgewiesen. Schließlich konnte gezeigt werden, daß G β 3 und auch G β 1 mit dem PDGF-Rezeptor interagieren kann. Hiermit beschäftigt sich ein weiteres Kapitel der Diskussion.

4.1. Interaktion von PDGF-Rezeptor, PTX-sensitiven G-Proteinen und der PLC γ

Die lange Zeit gültige Vorstellung, daß heterotrimere G-Proteine ausschließlich die Signale heptahelikaler Rezeptoren in die Zelle übertragen (Letterio et al., 1986) hat spätestens seit den frühen 90er Jahren eine Wandlung erfahren. Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen machen inzwischen eine Beteiligung von heterotrimeren G-Proteinen an der frühen Signaltransduktion einiger klassischer RTK wahrscheinlich. Hierzu gehören insbesondere die Arbeiten von Yang et al. (1991, 1993, 1994) zur Signaltransduktion von EGF an Rattenhepatozyten.

Im Falle des PDGF-Rezeptors hingegen existieren nur wenige Untersuchungen zu dieser Fragestellung. So analysierten Huang und Ives (1989) PDGF-Signale an permeabilisierten glatten Gefäßmuskelzellen aus der Rattenaorta. In Anwesenheit von GTP γ S (einem GTP-Analogon) beobachteten sie eine Zunahme der durch PDGF stimulierten IP₃-Bildung. Das GDP-Analog, GDP β S hemmte die durch PDGF stimulierte IP₃-Bildung. Solche Untersuchungen können als Indiz für eine Beteiligung von G-Proteinen an der Signalübertragung von PDGF gewertet werden; allerdings bleibt unklar, ob es sich um heterotrimere, z.B. PTX-sensitive G-Proteine handelt oder um sogenannte kleine G-Proteine.

Zhang et al. (1994) beobachteten an glatten Gefäßmuskelzellen nach PTX-Vorbehandlung eine Hemmung der durch PDGF stimulierten Proliferation. Eine weitere Arbeitsgruppe (Choudhury et al., 1994) wies an humanen Mesangiumzellen eine Hemmung der durch PDGF induzierten DNA-Synthese in Anwesenheit von PTX nach. Beide Arbeitsgruppen diskutieren allerdings primär unspezifische Effekte durch die anhaltende PTX-Wirkung auf die Zellproliferation.

Neben diesen eher indirekten Hinweisen auf eine Beteiligung von PTX-sensitive G-Proteinen an der Signalübertragung von PDGF, publizierten Conway et al. (1999) - nach Abschluß der eigenen experimentellen Untersuchungen - daß PTX-sensitive G-Proteine an der durch PDGF stimulierten Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade an glatten Muskelzellen der Atemwege beteiligt sind. Damit werden die eigenen Ergebnisse im Hinblick auf die Interaktion von PDGF-Rezeptor und G-Protein durch eine unabhängige Untersuchung voll bestätigt. Allerdings untersuchten Conway et al. andere Effektorsysteme (MAP-Kinase) als wir.

Analog zu den Untersuchungen von Yang et al. zum EGF-Rezeptor stand bei unseren Experimenten die Frage einer PTX-sensitiven Aktivierung der PLC γ durch PDGF im Mittel-

punkt. Hierzu wurde an humanen Hautfibroblasten zunächst der Einfluß von PDGF auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisierung untersucht. Diese Ca^{2+} -Mobilisierung wird nach Stimulation durch PDGF im wesentlichen durch die PLC γ -vermittelte IP_3 -Bildung ausgelöst (Heldin et al., 1998), wobei auch weiteren second messenger Substanzen, wie intrazellulär gebildetem SPP, eine gewisse - allerdings nachrangige - Bedeutung beigemessen wird (Olivera und Spiegel, 1993).

Erwartungsgemäß kam es nach Stimulation der Hautfibroblasten mit PDGF zu einem deutlichen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} auf 156 ± 35 nM. Durch eine Vorbehandlung mit PTX konnten die durch PDGF induzierten Ca^{2+} -Signale in ihrer Amplitude um etwa 50% gehemmt werden (siehe 3.1.).

Kontrollexperimente wurden mit den Agonisten Bradykinin, LPA und SPP durchgeführt. Hierbei konnte erwartungsgemäß gezeigt werden, daß die durch LPA und SPP stimulierten Ca^{2+} -Signale durch eine Vorbehandlung mit PTX deutlich gehemmt werden, während PTX keinen signifikanten Einfluß auf die durch Bradykinin stimulierten Signale ausübte. Dies stimmt überein mit der bekannten Kopplung der LPA- und SPP-Rezeptoren an PTX-sensitive G-Proteine (Pietruck et al., 1997; Spiegel und Milstien, 2000), bzw. des Bradykininrezeptors an G-Proteine der $\text{G}\alpha_q$ -Familie (Pietruck et al., 1996). Darüberhinaus belegen diese Experimente, daß PTX nicht „unspezifisch“ sämtliche Signale in Hautfibroblasten blockiert, bzw. die Fibroblasten so schädigt, daß keine vernünftigen Reaktionen mehr ausgelöst werden können. Obwohl die bis hierher gezeigten Experimente nahe legen, daß PTX-sensitive G-Proteine wesentliche Signalphänomene von PDGF an Hautfibroblasten vermitteln, tragen diese Untersuchungen wenig zum Verständnis der dabei beteiligten Mechanismen bei. So ist z.B. nicht ausgeschlossen, daß die PDGF-Gabe die Sekretion von autokrinen Mediatoren stimuliert, deren Wirkungen über einen heptahelikalen Rezeptor und PTX-sensitive G-Proteine vermittelt werden. Damit würde die PTX-Wirkung nicht am PDGF-Rezeptor selbst, sondern an parallelen Signaltransduktionsmechanismen ansetzen. In Analogie zu den Ergebnissen von Yang et al. (1991, 1993) zum EGF-Rezeptor sollte daher durch Koimmunpräzipitationsexperimente eine mögliche direkte Interaktion von PDGF-Rezeptor und PTX-sensitiven G-Proteinen analysiert werden.

Hierzu wurde zunächst aus Zellysaten humaner Hautfibroblasten mit geeigneten Antikörpern der PDGF-Rezeptor präzipitiert und die Koimmunpräzipitation von $\text{G}\alpha_q$ -Proteinen in einer sich anschließenden durch PTX-katalysierten *in vitro* ADP-Ribosylierungsreaktion untersucht. In unstimulierten Lysaten fand sich bereits eine schwache Assoziation des Rezeptors

mit $G\alpha_i$ -Proteinen. Nach Stimulation mit PDGF nahm dann die Menge kopräzipitierbarer G-Proteine deutlich zu. Sie erreichte 3 min nach der Stimulation mit PDGF ihr Maximum, konnte aber auch noch 10 min nach Beginn der Stimulation nachgewiesen werden (siehe auch 3.2.).

Diese Befunde belegen eindeutig die direkte Interaktion von PTX-sensitiven G-Proteinen mit dem PDGF-Rezeptor. Offensichtlich kommt es nach Stimulation des Rezeptors zu einer weiteren Assoziation mit G-Proteinen. Da der aktivierte und dimerisierte PDGF-Rezeptor einen großen Multiproteinkomplex ausbildet, bleibt offen, an welchen Strukturen sich die PTX-sensitiven G-Proteine anlagern. Ein weiterer elementarer Bestandteil dieses Multiproteinkomplexes ist die PLC γ (Kumjian et al., 1989). Da sich die PTX-Behandlung besonders auf die Bildung von IP₃ und die nachfolgenden Ca²⁺-Signale auswirkte, lag es nahe zu untersuchen, ob auch die PLC γ in einen Komplex mit dem G-Protein tritt. Auch in diesen Experimenten war es möglich, nach Immunpräzipitation mit anti-PLC γ -Antikörpern kopräzipitierte $G\alpha_i$ -Proteine mittels PTX-katalysierter *in vitro* ADP-Ribosylierung nachzuweisen. Im Einklang mit den Präzipitationen des PDGF-Rezeptors beobachteten wir auch hier, nach Stimulation mit PDGF, eine Zunahme kopräzipitierender $G\alpha$ -Proteine (siehe 3.2.). Wie im Falle des PDGF-Rezeptors kann man auch aus diesen Experimenten nicht auf die genaue Konstellation der Interaktion von PLC γ mit G-Proteinen schließen, d.h. es ist unklar, ob die G-Proteine direkt an die PLC γ binden oder über weitere (Adapter-) Moleküle an das Enzym andocken. Zusammengefaßt entsprechen unsere Ergebnisse denen von Yang et al. (1991, 1993) die für den EGF-Rezeptors an Rattenhepatozyten gewonnen wurden und denen von Piiper et al. (1997) am Beispiel des EGF-Rezeptors an Pankreasdrüsenzellen.

Aktivierung der PLC γ durch G $_i$ -Proteine

Wie kann man sich nun ein Szenario vorstellen, bei dem PTX-sensitive G-Proteine an der Aktivierung der PLC γ beteiligt sind?

Eine Aktivierung von PLC γ -Isoformen wird typischerweise nach Stimulation von RTK beobachtet (Kamat und Carpenter, 1997). Aber auch die Stimulation des T- oder B-Zellrezeptors von Lymphozyten resultiert in einer Stimulation der PLC γ -Aktivität (Kamat und Carpenter, 1997). Für einige heptahelikale Rezeptoren (z.B. Angiotensin II-Rezeptor, Thrombinrezeptor) konnte ebenfalls gezeigt werden, daß diese die PLC γ aktivieren können (Rhee und Bae, 1997). Parallel zur Aktivierung wird eine Phosphorylierung an Tyrosinresten

der PLC γ beobachtet. So wurde im Falle des aktivierten PDGF-Rezeptors oder des EGF-Rezeptors gezeigt, daß die PLC γ nach Assoziation über SH2-Domänen an Tyrosinresten phosphoryliert wird (Ji et al., 1999; Chattopadhyay et al., 1999). Dabei bleibt allerdings umstritten, ob die alleinige Tyrosinphosphorylierung für die Aktivierung der PLC γ ausreichend ist (Berridge, 1993). So zeigten Lee und Rhee (1995) in *in vitro* Experimenten, daß die alleinige Tyrosinphosphorylierung nicht zu einer Steigerung der katalytischen Aktivität der PLC γ führt. Neuere Befunde legen nahe, daß die Aktivität der PLC γ durch PLA $_2$ -Produkte wie Arachidonsäure, das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau und durch Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP $_3$) moduliert werden kann (Sekiya et al., 1999; Bae et al., 1998). In diesem Szenario ist die Modulation der PLC γ -Aktivität der Stimulation von PI3-Kinase-Isoformen und der damit verbundenen Zunahme des PIP $_3$ -Spiegels nachgeschaltet (Bae et al., 1998).

Für einen komplexen Aktivierungsmodus der PLC γ - neben der Tyrosinphosphorylierung - spricht die Tatsache, daß die PLC γ als zytosolisches Enzym für ihre Funktion mit dem membranständigen Substrat PIP $_2$ in Kontakt treten muß. Yang et al. (1994) zeigten, daß es nach Stimulation des EGF-Rezeptors an Rattenhepatozyten tatsächlich zu einer Translokation der PLC γ aus dem Zytosol an die Zellmembran kommt. Mechanistisch konnte eine Bindung der PLC γ über ihre SH3-Domäne an Aktinfilamente des Zytoskeletts wahrscheinlich gemacht werden. Weiterhin wird spekuliert, daß die N-terminale PH-Domäne bzw. die durch die SH2-SH3-Domäne getrennte PH-Domäne der PLC γ an der Membranassoziation (über die Bindung an ihr Substrat PIP $_2$) beteiligt sind (Kamat und Carpenter, 1997; Irvine, 1998).

In diesem Szenario spielen möglicherweise PTX-sensitive G-Proteine eine wichtige Rolle bei der Translokation der PLC γ an die Zellmembran. Gerade an dem mehrfach zitierten Beispiel des EGF-Rezeptors an Rattenhepatozyten konnten Yang et al. (1994) nachweisen, daß nach Stimulation mit EGF parallel zur Translokation der PLC γ an die Membran, die Menge an mit der PLC γ kopräzipitierbarem G α_i zunahm. Die Tyrosinphosphorylierung der PLC γ selbst war dabei durch PTX nicht zu hemmen (Yang et al., 1993). Dies legt nahe, daß PTX-sensitive G-Proteine an der Translokation der PLC γ an die Membran bzw. membranständige Zytoskelettanteile beteiligt sind, während die direkte Interaktion von PLC γ und RTK (am Beispiel des EGF-Rezeptors), sowie die daraus resultierende Tyrosinphosphorylierung nicht durch PTX beeinflußt werden.

Diese Mechanismen könnten auch die eigenen Befunde für den PDGF-Rezeptor im Falle der Hautfibroblasten erklären. Aus den eigenen *in vitro* ADP-Ribosylierungs-Daten läßt sich eine Interaktion von $G\alpha_i$ -Proteinen sowohl mit dem PDGF-Rezeptor als auch mit der $PLC\gamma$ nachweisen. Unklar bleibt allerdings, ob an der wechselseitigen Bindung Adapterproteine beteiligt sind, und ob bereits zytosolische $PLC\gamma$ -Moleküle an G_i -Proteine binden oder dies erst innerhalb eines aktivierten PDGF-Rezeptor-Multiproteinkomplexes stattfindet. Die zunehmende Assoziation von G_i -Proteinen mit dem Rezeptor bzw. der $PLC\gamma$ nach Stimulation der Zellen mit PDGF macht eine direkte Interaktion innerhalb eines Multiproteinkomplexes aus aktiviertem Rezeptor, der $PLC\gamma$ und dem G_i -Protein wahrscheinlich.

Mechanismus der G-Protein-Aktivierung

Während die bisherigen Ergebnisse die wechselseitige und durch PDGF stimulierbare Interaktion von $G\alpha_i$ -Proteinen, dem PDGF-Rezeptor und der $PLC\gamma$ belegen, ist offen, ob es zu einer Aktivierung der PTX-sensitiven G-Proteine selbst kommt, d.h. wir wissen nicht, ob die G-Proteine nach Stimulation mit PDGF einen GTPase-Zyklus durchlaufen.

Da allerdings bekannt ist, daß PTX-sensitive G-Proteine regelmäßig als Heterotrimer durch PTX modifiziert werden und nur ausnahmsweise, unter speziellen experimentellen Bedingungen, ein alleiniges $G\alpha_i$ -Protein durch ADP-Ribosylierung modifiziert werden kann, spricht einiges dafür, daß bei der Assoziation mit PDGF-Rezeptor und $PLC\gamma$ das G-Protein - zumindest zeitweise - als Heterotrimer vorliegt. Das bedeutet, daß auch $G\beta\gamma$ -Dimere an der Interaktion mit dem PDGF-Rezeptor beteiligt sind. Ob es im weiteren Verlauf zu einer Aktivierung des G-Proteins kommt, bleibt derzeit offen. Versuche, die $GTP\gamma S$ -Bindung nach Stimulation mit PDGF zu quantifizieren, ergaben keine aussagekräftigen Befunde. Möglicherweise kann durch Markierungsexperimente mit reaktiven GTP-Analoga (z.B. Azidoanilid-GTP) und anschließender Immunpräzipitation der Nachweis geführt werden, daß nach PDGF-Stimulation die Menge an kovalent gebundenem GTP-Analog zunimmt. Dies würde bedeuten, daß es zu einem GDP/GTP-Austausch des $G\alpha_i$ -Proteins gekommen sein muß, und damit PDGF nicht nur die Assoziation zwischen G-Protein und Rezeptor stimuliert, sondern auch das G-Protein selbst aktiviert.

Neueste Befunde für den IGF-I-Rezeptor, einem nahen Verwandten des Insulinrezeptors, belegen, daß es zu einer konstitutiven Assoziation dieses Rezeptors mit PTX-sensitiven G-Proteinen kommt. Die Stimulation mit IGF-I führt dabei zur Dissoziation des G_i -Proteins in

die aktivierte $G\alpha_i$ -Untereinheit und ein $G\beta\gamma$ -Dimer (Hallak et al., 2000). Ein solcher Mechanismus wäre auch für den PDGF-Rezeptor denkbar, jedoch ist vollkommen unklar, wo genau die Interaktion von G_i -Proteinen und Rezeptor zu lokalisieren ist.

Wie in der Einleitung beschrieben, interagieren G-Proteine klassischerweise mit heptahelikalen Rezeptoren. In der Literatur werden aber auch Beispiele für die Interaktion mit anderen Rezeptortypen beschrieben. Nishimoto et al. (1989) konnten im Falle des IGF-II-Rezeptors eine direkte Aktivierung von G-Proteinen durch den Rezeptor zeigen. Beim IGF-II-Rezeptor handelt es sich weder um einen GPCR, noch um eine RTK. Daß dieser Rezeptor trotzdem mit G-Proteinen interagieren kann, wird einer bestimmten Domäne im Rezeptor zugeschrieben, die später von Birnbaumer (1995) als sogenanntes „Nishimoto-Couplon“ bezeichnet wurde. Als Modell für ein solches Nishimoto-Couplon wird ein 14 Aminosäuren großes Peptid aus Wespengift angesehen: Mastoparan. Nach Bindung an die Innenseite der Zellmembran formt Mastoparan eine amphiphile α -Helix-Struktur, die intrazellulären Schleifen von aktivierten GPCR ähneln (Higashijima et al., 1990). Hierdurch kommt es zu einer Aktivierung von - im wesentlichen - PTX-sensitiven G-Proteinen (Higashijima et al., 1988; Weingarten et al., 1990), die u.a. auch zu einer durch die $PLC\gamma$ katalysierten IP_3 -Bildung und Ca^{2+} -Mobilisierung führt (Okano et al., 1985).

Ein Mastoparan-ähnliches Strukturmotiv wurde für RTK wie den EGF-, PDGF- und Insulinrezeptor von Feinstein und Larhammar (1990) beschrieben. Bei diesem Motiv handelt es sich um eine Domäne, die sich in allen Rezeptoren unmittelbar an die Kinase-Region anschließt. Für den EGF- und den PDGF-Rezeptor liegt diese Mastoparan-ähnliche Domäne in der Nähe der Bindungsstelle der $PLC\gamma$ (siehe Abb. 1.1.).

Es wäre also vorstellbar, daß diese Struktur für die Assoziation und Aktivierung von G_i -Proteinen verantwortlich ist. Durch Bindung von PDGF an seinen Rezeptor könnte es zu Konformationsänderungen kommen, die eine Aktivierung von G-Proteinen über diese Mastoparan-ähnliche Struktur bedingt.

Experimentell könnte nach Herstellung und Expression von Deletionsmutanten des PDGF-Rezeptors, denen die Mastoparan-ähnliche Domäne fehlt, überprüft werden, ob die durch PDGF stimulierte Aktivierung der $PLC\gamma$ weiterhin PTX-sensitiv ist. Weiterhin könnte in Koimmunpräzipitationsanalysen untersucht werden, ob eine Interaktion von PDGF-Rezeptor-Mutanten und G-Proteinen noch weiter möglich ist.

PDGF vermittelte Aktivierung von G-Proteinen und die verschiedenen Effektorsysteme

Die PTX-Behandlung führt an primären Hautfibroblasten zu einer deutlichen Hemmung mehrerer der durch PDGF stimulierten zellulären Effekte. So kommt es zu einer Verminderung der Ca^{2+} -Signale (siehe 3.1.), zur Hemmung der Chemotaxis (siehe 3.3.) und zu einer Blockade der Zellproliferation (siehe 3.4.). Andere Effekte wie die Tyrosinphosphorylierung des PDGF-Rezeptors und weiterer zellulärer Substrate bleiben durch die PTX-Behandlung unbeeinflusst (Schündeln, 2001).

Im Falle der $\text{PLC}\gamma$ konnten wir mechanistisch eine Interaktion mit PTX-sensitiven G-Proteinen nachweisen. Ob allerdings die Hemmung der $\text{PLC}\gamma$ -Aktivierung nach PTX-Behandlung auch für die verminderte Chemotaxis und Zellproliferation verantwortlich ist, bleibt offen. Jüngst konnte durch Rakhit et al. (2000) gezeigt werden, daß die Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade durch PDGF an glatten Muskelzellen der Atemwege durch PTX gehemmt werden kann. Dies könnte in unserem Fall für die Hemmung der durch PDGF stimulierten Zellproliferation nach Behandlung mit PTX verantwortlich sein. Zwar können starke Änderungen in der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration die Aktivität der MAP-Kinase modulieren, gleichwohl erscheint dies bei den von uns gemessenen moderaten Änderungen des $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ eher nicht in Frage zu kommen (siehe 3.1.). Zahlreiche Beispiele belegen, daß es im Falle von PTX-sensitiven G-Proteinen zu einer Stimulation der MAP-Kinase-Kaskade über frei werdende $\text{G}\beta\gamma$ -Untereinheiten kommt. Weiterhin wurde jüngst mehrfach gezeigt, daß freie $\text{G}\beta\gamma$ -Dimere - und nicht aktivierte $\text{G}\alpha_i$ - Proteine - essentiell für die PTX-sensitive Stimulation der Chemotaxis sind (Arai et al., 1997; Neptune und Bourne, 1997). Es liegt daher nahe zu vermuten, daß es nach Stimulation mit PDGF zur Bildung freier $\text{G}\beta\gamma$ -Dimere kommen kann, die ihrerseits weitere Effekte (z.B. MAP-Kinase-Kaskade, Chemotaxis) triggern können. Dabei sind die genauen Signaltransduktionskaskaden, wie $\text{G}\beta\gamma$ -Dimere diese Effekte stimulieren, trotz intensiver Forschungsbemühungen, nur unvollständig verstanden. Im Falle der MAP-Kinase-Kaskade kommt es über die Interaktion mit Adapterproteinen zu einer Aktivierung von Ras und Raf (Linseman et al., 1995). Weiterhin scheinen an diesen Aktivierungsschritten Tyrosinkinasen aus der Src-Familie und PI3-Kinasen beteiligt zu sein (Luttrell et al., 1997; Lopez-Illasaca et al., 1997). Freien $\text{G}\beta\gamma$ -Dimeren kommt bei diesen Signalschritten häufig eine Adapterfunktion zu. So weiß man, daß $\text{G}\beta\gamma$ -Dimere mit PH-Domänen verschiedener Proteine interagieren können. Bei PH-Domänen handelt es sich um in ihrer Aminosäuresequenz wenig konservierte Strukturdomänen aus

sieben anti-parallelen β -Faltblättern und einer C-terminalen α -Helix, die in vielen Signalproteinen vorgefunden werden, so u.a. bei PLC β - und PLC γ -Isoformen, der β -ARK und BTK. PH-Domänen können PIP₂ binden, es wurde aber auch in vielen Studien gezeigt, daß G $\beta\gamma$ -Proteine mit diesen Domänen interagieren können. So konnte für β -ARK, PLC γ (Touhara et al., 1994) und BTK (Tsukada et al., 1994) gezeigt werden, daß der C-terminale Anteil der PH-Domäne (C-terminale α -Helix) für die spezifische Bindung mit G $\beta\gamma$ -Dimeren verantwortlich ist. Funktionell ist die Interaktion von PH-Domäne mit G $\beta\gamma$ -Proteinen für die Translokation z.B. der β -ARK zur Zellmembran hin verantwortlich, wo sie durch Phosphorylierung des β -Adrenozeptors zur Desensibilisierung beiträgt (Inglese et al., 1994). Unsere ADP-Ribosylierungsexperimente belegen, daß G α_i -Proteine, höchstwahrscheinlich als Heterotrimere zusammen mit G $\beta\gamma$ -Dimeren, mit der PLC γ interagieren. Es ist aber gut vorstellbar, daß insbesondere nach Aktivierung des G-Proteins, eine Interaktion von G $\beta\gamma$ -Dimeren mit der PH-Domäne der PLC γ stattfindet und möglicherweise für die Translokation zur Zellmembran mitverantwortlich ist. Diese Hypothesen bedürfen natürlich der experimentellen Bestätigung.

Reactive Oxygen Species („ROS“) - Hypothese

Abschließend muß noch kurz eine weitere Hypothese diskutiert werden, wie PTX-sensitive G-Proteine an der Aktivierung der PLC γ durch PDGF beteiligt sein könnten. Wie bereits eingangs ausgeführt, ist die Aktivierung der PLC γ ein komplexer Vorgang, der neben der Tyrosinphosphorylierung auch die Translokation zur Zellmembran erfordert (Yang et al., 1994). Neuere Befunde belegen, daß auch intrazellulär gebildetes H₂O₂ für die Aktivierung der PLC γ von Bedeutung ist (Bae et al., 1997).

H₂O₂ gehört zu den sogenannten reaktiven Sauerstoff (Oxygen) Spezies („ROS“). Es konnte gezeigt werden, daß eine Reihe von Zelllinien nach Stimulation z.B. mit Angiotensin II, LPA oder aber auch PDGF, H₂O₂ bilden können. H₂O₂ kann die Funktion von Tyrosinphosphatasen hemmen, so daß es zu einer Verschiebung des intrazellulären Gleichgewichts von Tyrosinphosphatase- und Tyrosinkinaseaktivität kommt. Die Hemmung von Tyrosinphosphatasen durch H₂O₂ kann zu einer - kurzzeitigen - Begünstigung der Tyrosinphosphorylierung verschiedener Proteine, u.a. der PLC γ , führen (Finkel, 1998; Bae et al., 1997).

Für den Insulinrezeptor konnte eine durch Insulin stimulierte NADPH-abhängige Generation von H_2O_2 in humanen Adipozyten nachgewiesen werden (Krieger-Brauer et al., 1997). Durch PTX, anti- $\text{G}\alpha_i$ -Antikörper und $\text{GDP}\beta\text{S}$, das G-Proteine blockiert, konnte die durch Insulin induzierte Produktion von H_2O_2 gehemmt werden. Weiter konnte in Immunpräzipitationsversuchen eine direkte Interaktion des Insulinrezeptors und $\text{G}\alpha_i$ -Untereinheiten gezeigt werden. Man vermutet daher, daß der stimulatorische Effekt von Insulin auf die Bildung von H_2O_2 über G_i -Proteine vermittelt wird. Würde dieser Mechanismus auch im Falle des PDGF-Rezeptors greifen, könnte dies ebenfalls die Aktivität der $\text{PLC}\gamma$ modulieren.

Unsere Befunde belegen eher, daß es zu einer direkten Interaktion von $\text{PLC}\gamma$ und G-Proteinen kommt, es ist aber nicht auszuschließen, daß ein solcher indirekter Mechanismus zusätzlich an der PTX-sensitiven Regulation der $\text{PLC}\gamma$ -Aktivität beteiligt sein könnte.

Zelltypabhängigkeit der Beteiligung PTX-sensitiver G-Proteine an der Signaltransduktion von PDGF

Wir führten die hier vorgestellten Untersuchungen überwiegend an primären Hautfibroblasten durch. Wie bereits ausgeführt, wurden in früheren Untersuchungen, die überwiegend an etablierten Zelllinien durchgeführt wurden, keine Effekte einer PTX-Behandlung auf die Signaltransduktion von PDGF gefunden. Sehr viele dieser Untersuchungen wurden an sogenannten 3T3-Fibroblasten vorgenommen. Wir wiederholten daher die entscheidenden Experimente an diesem Zelltyp. Interessanterweise konnten die durch PDGF ausgelösten Ca^{2+} - und IP_3 -Signale an NIH3T3 nicht durch eine Behandlung mit PTX gehemmt werden. Andererseits gelang es in Koimmunpräzipitations-Experimenten auch im Falle der NIH3T3-Zellen eine Interaktion von PTX-sensitiven G-Proteinen mit dem PDGF-Rezeptor nachzuweisen (siehe 3.2.2.). Diese Befunde belegen, daß die Interaktion von RTK mit PTX-sensitiven G-Proteinen zwar ein weit verbreitetes Phänomen ist, daß dieser Interaktion jedoch nicht in jedem Falle eine funktionelle Bedeutung zukommt.

Wir haben bereits an den primären Hautfibroblasten gesehen, daß die Behandlung mit PTX – und zwar in einer Konzentration, die sämtliche $\text{G}\alpha_i$ -Proteine inaktiviert – zu einer deutlichen Hemmung der Ca^{2+} -Signale führt, nicht aber zu ihrer vollständigen Blockade. Dies bedeutet, daß der PDGF-Rezeptor auch ohne funktionelle G-Proteine prinzipiell in der Lage ist, Ca^{2+} -Signale zu generieren. In Anwesenheit von PTX-sensitiven G-Proteinen kommt es allerdings zu einer deutlichen Steigerung der Signalthöhe, was für einen, das Signal amplifizierenden

Effekt des G-Proteins spricht. In diesem Szenario ist es gut vorstellbar, daß bei bestimmten Zelltypen das ohne G-Proteine vermittelte Ca^{2+} -Signal unter diesen Bedingungen nicht mehr weiter gesteigert werden kann. Dies scheint auch für andere Effektoren zuzutreffen. In der Tabelle 4.1. sind die bekannten Untersuchungen zur Beteiligung von PTX-sensitiven G-Proteinen an der Signaltransduktion von RTK zusammengestellt. Man erkennt - wie bereits eingangs erwähnt - große, zelltypabhängige Unterschiede. Bei genauerer Analyse fällt aber auf, daß eine Beteiligung PTX-sensitiver G-Proteine häufig im Falle nativer Zellen oder Zellen aus der Primärkultur gefunden wird, während bei etablierten oder transformierten Zelllinien dies nicht beobachtet wird.

Als mögliche Ursachen hierfür wird von Liang und Garrison (1991) ausgeführt, daß im Falle des EGF-Rezeptors bei vielen Zelllinien (z.B. A341-Zellen) eine Überexpression vorliegt, und daß unter diesen Bedingungen die G-Protein unabhängige Aktivierung der $\text{PLC}\gamma$ für die Stimulation des Ca^{2+} -Signals ausreicht.

Ähnlich konnte am Beispiel der MAP-Kinasen-Aktivierung Luttrell et al. (1995) im Falle des Insulinrezeptors bei normaler Rezeptorexpression eine PTX-Sensitivität nachweisen, die nach Überexpression des Rezeptors aufgehoben war.

Physiologischerseits ist davon auszugehen, daß die Ergebnisse an primären Zellen den Verhältnissen im Organismus eher nahe kommen als jene Befunde, die an transformierten Zelllinien erhoben werden. Wie bereits ausgeführt wurde, kennt man beim Menschen genetisch fixierte Unterschiede in der Signalübertragungsstärke nach Stimulation PTX-sensitiver G-Proteine (Pietruck et al., 1996). Wenn sich dies auch auf Aspekte der Signaltransduktion von PDGF auswirkt - was die Befunde von Pietruck zu belegen scheinen - so könnte den hier beschriebenen Interaktionen von G-Proteinen mit RTK eine große pathophysiologische Relevanz zukommen, da PDGF z.B. wichtige Funktionen bei fibrosierenden Entzündungen, der Entwicklung der Atherosklerose und bei der Wundheilung innehat.

Tabelle 4.1.: Übersicht zu Untersuchungen hinsichtlich einer Beteiligung PTX-sensitiver G-Proteine an der Signaltransduktion von RTK in verschiedenen Zelltypen

Signal/ Ligand	Zelltyp	Effekt	Referenz	
1) Effekt einer PTX-Vorbehandlung auf:				
<u>-IP₃-Bildung</u>				
PDGF	humane Hautfibroblasten	-	Schündeln, 2001	
EGF	frische Rattenhepatozyten	-	Johnson, 1987	
EGF	Rattenhepatozyten i. Primärkultur	-	Yang, 1993	
PDGF	VSMC (Passage 11-17, Ratte)	®	Huang, 1989	
<u>-Ca²⁺-Mobilisierung</u>				
PDGF	humane Hautfibroblasten	-	diese Arbeit	
EGF	frische Rattenhepatozyten	-	Johnson, 1987	
PDGF	NIH3T3-Zellen	®	diese Arbeit	
PDGF	WKY-Zellen (Passage 5-15)	®	Schündeln, 2001	
PDGF	SHR-Zellen (Passage 5-15)	®	Schündeln, 2001	
PDGF	VSMC (Passage 11-17, Ratte)	®	Huang, 1989	
<u>-DNA-Synthese</u>				
PDGF	humane Hautfibroblasten	-	diese Arbeit	
PDGF	VSMC (Passage 3-8, Meer-schweinchen)	-	Zhang, 1994	
PDGF	humane Mesangiumzellen	-	Choudhoury, 1994	
PDGF	3T3-Mausfibroblasten	®	Letterio, 1986	
<u>-Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade</u>				
PDGF	glatte Muskelzellen d. Atemwege	-	Conway, 1999	
IGF-I	neuronale Zellen der Ratte	-	Hallak, 2000	
2) Koimmunpräzipitation G_i-Proteine mit:				
-RTK	PDGF	humane Hautfibroblasten	-	diese Arbeit
	PDGF	NIH3T3-Zellen	-	diese Arbeit
	EGF	frische Rattenhepatozyten	-	Yang, 1991, 1993
	EGF	frische Pankreaszellen (Ratte)	-	Piiper, 1997
	EGF	WB-Zellen (Ratte)	—	Yang, 1991
-PLCg	PDGF	humane Hautfibroblasten	-	diese Arbeit
	PDGF	NIH3T3-Zellen	®	diese Arbeit
	EGF	Rattenhepatozyten	-	Yang, 1991, 1993
	EGF	frische Pankreaszellen (Ratte)	-	Piiper, 1997
	EGF	WB-Zellen (Ratte)	—	Yang, 1991
3) GTP-Bindung an G-Proteine:				
<u>-Zunahme der GTPγS-Bindung</u>				
EGF	frische Rattenhepatozyten	-	Liang, 1991	
CSF-1	humane Monozyten	-	Imamura, 1988	
Insulin	BC3H-1 Myozyten	-	Luttrell, 1990	
EGF	A431-Zellen (human)	®	Liang, 1991	
<u>-Hemmung durch GTPβS</u>				
EGF	frische Rattenhepatozyten	-	Liang, 1991	
PDGF	WBF-Zellen (Ratte)	®	Hasegawa-Sasaki, 1988	

„-“ bedeutet Zunahme, „-“ bedeutet Abnahme und „®“ bedeutet keine Veränderung hinsichtlich dieses Signals. „¾“ bedeutet, daß hier keine G_i-Proteine im Präzipitat nachweisbar waren. A431-Zellen: epidermoide Karzinomzellen, SHR-Zellen: Gefäßmuskelzellen der Aorta von hypertensiven Ratten, VSMC („vascular smooth muscle cells“): glatte Gefäßmuskelzellen, WB-Zellen: Leberepithelzellen der Ratte, WBF-Zellen: Fibroblastenlinie aus der Ratte, WKY-Zellen: Gefäßmuskelzellen der Aorta von normotensiven Ratten.

4.2. Gb3 und die Spleißvariante Gb3s: Rolle in der Signaltransduktion von PDGF?

Im Verlauf der Untersuchungen zur Interaktion von PDGF-Rezeptor und G_i -Proteinen wurden die hier erhobenen Befunde durch Erkenntnisse zur Genetik der Signaltransduktion PTX-sensitiver G-Proteine wesentlich erweitert. Wie bereits erwähnt, hatten Pietruck et al. (1996) eine verstärkte Signaltransduktion über PTX-sensitive G-Proteine in primären Hautfibroblasten von Patienten mit essentieller Hypertonie nachgewiesen. Die Zellen zeigten gesteigerte Ca^{2+} -Signale und eine erhöhte DNA-Synthese im Vergleich zu Zellen von gesunden Probanden. In gleicher Weise wurde überraschenderweise auch eine Verstärkung der Ca^{2+} -Signale und der DNA-Synthese nach Stimulation mit PDGF beobachtet. Als Ursache für die verstärkte Signaltransduktion über G_i -Proteine wurde ein Polymorphismus (C825T) im Gen der G-Proteinuntereinheit $G\beta 3$ (*GNB3*), der mit dem Auftreten einer $G\beta 3$ -Spleißvariante ($G\beta 3s$) assoziiert ist, wahrscheinlich gemacht (Siffert et al., 1998). In Abbildung 4.1. sind die durch PDGF stimulierten Ca^{2+} -Signale und die DNA-Synthese der Hautfibroblasten aus der genannten Arbeit in Abhängigkeit vom *GNB3* C825T Genotyp dargestellt.

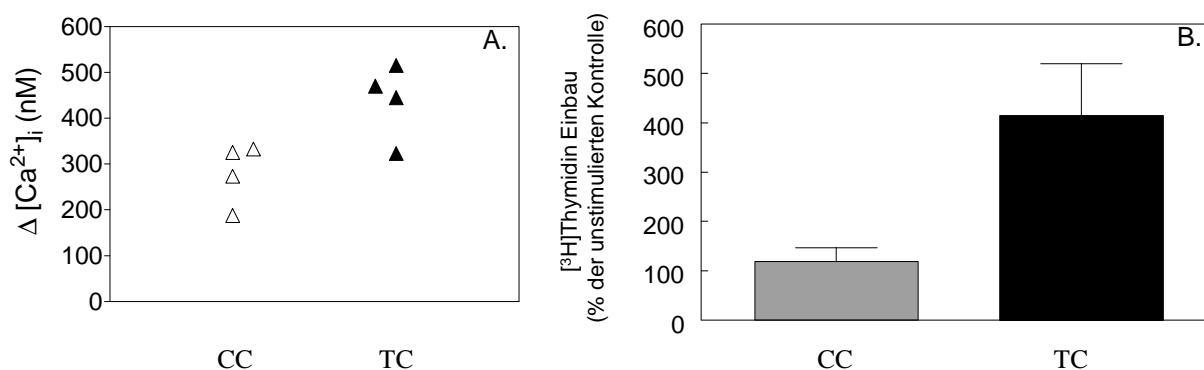


Abb. 4.1.: Ca^{2+} -Signale und DNA-Synthese in humanen Hautfibroblasten von Hypertonikern (TC) und gesunden Probanden (CC) nach Stimulation durch PDGF

A.: Dargestellt ist der maximale Ca^{2+} -Anstieg in humanen Hautfibroblasten von Hypertonikern (TC, geschlossene Symbole) und von gesunden Personen (CC, offene Symbole) nach Stimulation mit PDGF (20 ng/ml). Jedes Symbol steht für eine Zelllinie, die von einem entsprechend genotypisierten Individuum abstammt. Beim Vergleich aller CC-Genotypen (279 ± 32 nM, $n = 4$) mit allen TC-Genotypen (438 ± 41 nM, $n = 4$) konnte ein signifikant ($p = 0,02$) höherer Ca^{2+} -Anstieg bei T-Allel-Trägern gemessen werden.

B.: Die DNA-Synthese wurde durch den Einbau von $[^3H]$ Thymidin in die Zellen nach Stimulation mit PDGF in Prozent der unstimulierten Kontrolle bestimmt. Die Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt mit $n = 2$ für CC-Genotypen (119 ± 28 %) und $n = 4$ für den TC-Genotyp ($415 \pm 105,4$ %). Angegeben sind jeweils die Mittelwerte \pm S.E.M.

Diese Befunde führten zu der Vermutung, daß $G\beta 3$ bzw. $G\beta 3s$ an PTX-sensitiven Signaltransduktionsvorgängen von PDGF beteiligt sein könnten.

Gβ3 ist ein Mitglied der WD-Protein Familie und besitzt sieben sogenannte WD-Domänen. WD-Domänen dienen wahrscheinlich der Rekrutierung weiterer Proteine und der Ausbildung von Multiproteinkomplexen. Gβ3s fehlt eine dieser WD-Domänen: deletiert sind der äußere Strang der WD-Domäne 3 und die inneren Stränge von WD-Domäne 4 (siehe Abb. 4.2.).

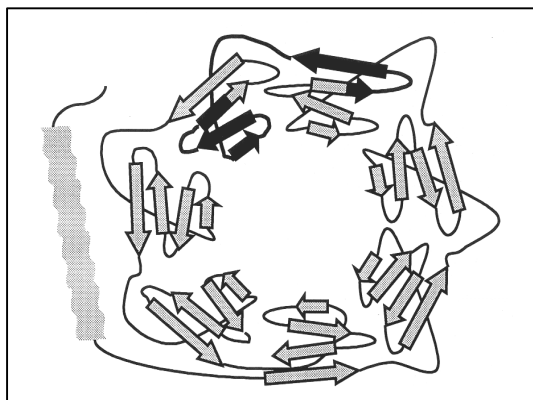


Abb. 4.2.: Modell-3D-Struktur des humanen Gβ3

Das Gβ3-Protein in seiner Propeller-Struktur bestehend aus sieben WD-Domänen. Bereiche, die in Gβ3s deletiert sind, sind in schwarz dargestellt.

Man muß annehmen, daß das Fehlen einer ganzen WD-Domäne zu einer gesteigerten Spannung innerhalb des Propeller-Proteins führt. Allerdings sind eine Reihe von WD-Proteinen mit nur vier, fünf oder sechs WD-Domänen beschrieben (Neer et al., 1994). Bei den WD-Proteinen mit nur vier bis sechs Propellern handelt es sich aber um keine Gβ-Proteine, sondern um Proteine, die u.a. an der RNA-Translation beteiligt sind (Neer et al., 1994). Man nimmt dennoch an, daß Gβ3s mit sechs WD-Propellern ein stabiles Protein ausbilden kann, die vermutete Struktur ist in Abbildung 4.2. dargestellt. Die Expression eines Proteins von der erwarteten Größe (Gβ3s) konnte - überwiegend bei Trägern des *GNB3* 825T-Allels - in Membranen aus Blutplättchen und B-Lymphozyten nachgewiesen werden (Siffert et al., 1998). Allerdings stellte sich die Frage, ob dieses Protein auch biologisch aktiv ist, und ob es für den „gain of function“ hinsichtlich der beschriebenen Signaltransduktionsvorgänge verantwortlich gemacht werden kann. Die Überexpression in Sf9-Zellen mit Hilfe von rekombinanten Baculoviren ergab, daß es in Anwesenheit eines Dimers aus Gβ3s und Gγ5 nach Stimulation mit Mastoparan zu einer Zunahme der Bindung von GTPγS an Gα_i kommt. Dieser in Anwesenheit von Gβ3s beobachtete Effekt entsprach quantitativ der GTPγS-Bindung in Anwesenheit von Gβ3γ5 und Gβ1γ5. In Abwesenheit von Gβγ-Dimeren wurde keine Zunahme der GTPγS-Bindung beobachtet. Diese Befunde legten nahe, daß Gβ3s hinsichtlich der Interaktion mit Gα_i-Proteinen funktionell dem Wildtyp Gβ3 entspricht. Allerdings war unklar, ob Dimere aus Gβ3s und geeigneten Gγ's in der Lage sind, Effektoren zu

stimulieren. Hierzu wurde u.a. die Interaktion mit Effektoren, die durch G β γ -Dimere (als die G β -Proteine als funktionelle Einheit auftreten) reguliert werden, untersucht. Die MAP-Kinase-Kaskade als Signaltransduktionsweg in der Proliferationskontrolle von Zellen stellt hierbei ein wichtiges Effektorsystem dar. Es ist bekannt, daß die MAP-Kinase durch freie G β γ -Dimere über einen Ras-abhängigen Signalweg aktiviert werden kann (Della Roca et al., 1997). Im Falle von G β 3 war kaum etwas zu G γ -Spezifitäten aus der Literatur bekannt. Daher wurden G β 3 bzw. G β 3s in Kombination mit verschiedenen G γ -Untereinheiten in HEK-293tsa- und COS-7-Zellen exprimiert und die Aktivierung einer koexprimierten HA-markierten MAP-Kinase (HA-ERK1), die auf Stimulation ähnlich wie endogene MAP-Kinasen reagiert (Meloche et al., 1992), in einem *in vitro* Immunkomplex-Kinase-Assay untersucht (siehe 3.5.). Die Expression von G β γ -Dimeren, bestehend aus G β 3 oder G β 3s und G γ 2, G γ 5, G γ 8c oder G γ 12, führte zur Stimulation der MAP-Kinase (36 - 391 %) in den untersuchten Zelllinien. Es konnte gezeigt werden, daß G β 3 und G β 3s in den hier gezeigten Untersuchungen identische G γ -Spezifitäten besitzen. Überraschenderweise führte bereits die alleinige Expression von G β 3s, nicht aber die von G β 3, zu einer signifikanten Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade. Auch für die alleinige Expression von G β 1 wurde eine Zunahme der MAP-Kinase Aktivität beobachtet. Es ist davon auszugehen, daß die Überexpression von G β -Proteinen den Pool freier G β γ -Dimere erhöhen kann, indem diese exprimierten G β -Proteine mit endogenen G γ -Proteinen freie G β γ -Dimere bilden können. Untersuchungen zur Aktivierung des G α_i GDP/GTP-Austausches durch Stimulation des m2 muskarinergen Acetylcholinrezeptors in Anwesenheit von G β 3 oder G β 3s legen weiter nahe, daß G β 3s die G α_i *GDP-Bindung weniger gut stabilisiert als das G β 3-Protein (Roskopf, unpubliziert). Dieser Mechanismus könnte den Anteil freier G β 3s γ -Dimere weiter erhöhen und für die bereits basale Stimulation der MAP-Kinase-Kaskade in Anwesenheit von G β 3s verantwortlich sein. Zumindest sind diese Befunde ein erstes Korrelat zu der gesteigerten Proliferation von Zellen hypertensiver Spender, die das *GNB3* 825T-Allel tragen (Pietruck et al., 1996) und aus denen G β 3s kloniert wurde.

Parallel hierzu wurde der Einfluß von G β 3 bzw. G β 3s auf ein weiteres Effektorenzym, die PLC β 2, die ebenfalls durch freie G β γ -Dimere stimuliert werden kann (Rhee und Bae, 1997), untersucht. Wurde PLC β 2 mit G γ 5, G γ 11 oder G γ 12 und G β 3 bzw. G β 3s in COS-7-Zellen koexprimiert, so konnte ein signifikanter Anstieg der durch PLC β 2 katalysierten IP $_3$ -Bildung

(30 - 100 %) beobachtet werden. Weiterhin wurde der Effekt von G β 3 bzw. G β 3s auf die Rezeptor-vermittelte Stimulation von PLC β 2 untersucht. Dazu wurde PLC β 2 und der muskarinerge Acetylcholinrezeptor (m2mAChR) zusammen mit G α _i2, G γ 12 und entweder G β 3 oder G β 3s in COS-7-Zellen koexprimiert. Die Aktivierung des Rezeptors durch Carbachol führte dann in Zellen, die G β 3s exprimierten, zu einer signifikant höheren IP₃-Bildung (92 ± 30 %) im Vergleich zu COS-7-Zellen mit dem Wildtyp Protein (56 ± 21 %) (Kohnen, Kirchberg und Rosskopf, unpubliziert).

Diese Befunde belegen, daß G β 3s zusammen mit bestimmten G γ -Untereinheiten in der Lage ist, Effektoren wie die MAP-Kinase oder die PLC β 2 zu stimulieren, und es sich somit bei G β 3s um eine biologisch funktionell aktive G β 3-Untereinheit handelt.

Wie aber läßt sich nun diese biologische Funktionalität und die gesteigerte Aktivierung bestimmter Effektorsysteme erklären?

Aufgrund von Homologievergleichen der einzelnen WD-Domänen verschiedener G β -Proteine und ihrer starken phylogenetischen Konservierung, sowie aufgrund von „Alanin-Scanning“-Mutagenese-Experimenten wurde die Hypothese aufgestellt, daß die einzelnen WD-Domänen spezifisch für die Interaktion mit bestimmten Effektoren verantwortlich sind (Clapham und Neer, 1997; Ford et al., 1998).

Die G γ -Untereinheit erstreckt sich entlang der Unterseite von G β und tritt dabei mit den WD-Domänen 1, 5, 6 und 7 in Kontakt (Neer und Smith, 1996). Dabei definieren v.a. Aminosäurereste der WD-Domäne 5 die Spezifität von G $\beta\gamma$ -Interaktionen (Clapham und Neer, 1997). Diese Bereiche sind in G β 3s nicht von der Deletion betroffen, so daß dies möglicherweise erklärt, warum G β 3s ebenso wie das Wildtyp G β 3 mit G γ -Untereinheiten dimerisieren kann und auch die Auswahl der G γ -Partner erhalten bleibt. Dies wird durch unsere Untersuchungen unterstützt, in denen wir - für die untersuchten G γ -Proteine - identische G γ -Spezifitäten für G β 3s und G β 3 zeigen konnten.

Möglicherweise ist die Interaktion mit G α -Untereinheiten durch den Verlust der WD-Domänen in G β 3s betroffen (Iiri et al., 1998). Im Heterotrimer ist die G α -Untereinheit asymmetrisch an der Oberseite von G β lokalisiert und tritt dabei mit den WD-Domänen 1, 2 und 3 in Kontakt (Clapham und Neer 1997). Unter „normalen“ Bedingungen stabilisiert das G $\beta\gamma$ -Dimer den inaktiven G α *GDP-Zustand durch spezifische Interaktionen mit der sogenannten „switch II“-Region von G α und ermöglicht gleichzeitig die Interaktion von G α mit zytoplasmatischen Domänen eines geeigneten GPCR. Es wäre denkbar, daß die strukturellen

Veränderungen in Gβ3s zu der bereits erwähnten Destabilisierung der Bindung von GDP an die Gα-Untereinheit führen. Weiterhin könnte durch Gβ3sγx die Affinität der Gα-Untereinheit zum entsprechenden GPCR erhöht werden und eine verbesserte Rezeptor-Ansprechbarkeit ausgelöst werden.

Dies würde die effizientere Wirkung von Gβ3s im Vergleich zu Gβ3 auf die von uns untersuchten Effektorsysteme (MAP-Kinase, PLCβ2) verständlicher machen. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen müßten in Rekonstitutionsexperimenten mit Gα- und Gγ-Untereinheiten und aufgereinigtem Gβ3s untersucht werden.

Nachdem nun der Nachweis der biologischen Funktionalität für Gβ3s erfolgt war, haben wir uns in weiteren Untersuchungen mit der Rolle von Gβ3 bzw. Gβ3s in der durch PDGF stimulierten Signaltransduktion beschäftigt. Als Hinweis für eine Beteiligung von Gβ3 bzw. Gβ3s an den Signaltransduktionsvorgängen von PDGF haben wir versucht, eine direkte Interaktion von Gβ3 und dem PDGF-Rezeptor nachzuweisen. Hierzu wurde eine Koimmunpräzipitation unter Verwendung von HA-markierten Gβ-Proteinen durchgeführt. Wir konnten schließlich eine direkte Assoziation von Gβ-Proteinen - und zwar für Gβ3 und Gβ1 - mit dem aktivierten PDGF-Rezeptor nachweisen (siehe 3.6.). Dies legt nahe, daß der PDGF-Rezeptor mit heterotrimeren G-Proteinen assoziiert, was auch die Befunde zur PTX-katalysierten *in vitro* ADP-Ribosylierung nahe legen (siehe 3.2.). Trotz vielfältiger Bemühungen war es nicht möglich, eine direkte Interaktion von Gβ3s mit dem PDGF-Rezeptor zu zeigen, da auf Höhe der erwarteten Gβ3s-Bande eine starke unspezifische Reaktion des Antikörpers auftrat. Die Analyse für Gβ1 und Gβ3 war davon - auf Grund des höheren Molekulargewichtes - nicht betroffen. Zwar legen die Befunde von Pietruck et al. (1996) nahe, daß auch Gβ3s mit dem PDGF-Rezeptor interagieren kann, bis zum endgültigen Nachweis durch Immunpräzipitationsuntersuchungen muß dies jedoch weiter hypothetisch bleiben. Leider gibt es kommerziell keine geeigneten Gβ3-Antikörper mit einer befriedigenden Spezifität. Derzeit arbeitet die Arbeitsgruppe daran, eigene Gβ3-Antikörper so aufzureinigen, daß damit Immunpräzipitationsuntersuchungen durchgeführt werden können. Es ist zu hoffen, daß damit diese Frage beantwortet werden kann.

Die Aufklärung der Beziehung zwischen der G-Proteinuntereinheit Gβ3/Gβ3s und RTK bleibt weiter ein wichtiges Thema, um Krankheitsbilder wie Hypertonie und damit assoziierte Erkrankungen wie koronare Herzerkrankungen oder Atherosklerose besser zu verstehen.

Eine verstärkte Signaltransduktion über PTX-sensitive G-Proteine, wie es für Patienten mit essentieller Hypertonie, die das 825-T-Allel tragen, beschrieben ist und mit dessen Vorkommen Gβ3s assoziiert ist, könnte auch zur Entwicklung von Atherosklerose oder Linksherzhypertrophie beitragen. Es ist bekannt, daß Wachstumsfaktoren wie PDGF in der Pathogenese dieser Erkrankungen eine Rolle einnehmen.

Erst kürzlich konnte von Poch et al. (2000) gezeigt werden, daß bei Patienten mit essentieller Hypertonie das Auftreten einer Linksherzhypertrophie bei Trägern des 825T-Allels gehäuft vorkommt.

Hier wird deutlich, wie wichtig es ist die zugrunde liegenden Signalmechanismen zu verstehen, die Frage nach einer Interaktion dieser beiden paradigmatischen Signaltransduktionswege zu untersuchen, um dadurch möglicherweise Einblick in die Ursachen pathophysiologischer Prozesse zu gewinnen.

5. Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung, ob Pertussistoxin (PTX)-sensitive G (GTP-bindende)-Proteine an der Signaltransduktion des Rezeptors für Platelet-derived Growth Factor (PDGF) beteiligt sind. Nach bisheriger Auffassung verläuft die initiale Signaltransduktion von Rezeptortyrosinkinasen (RTK) und von an G-Proteine koppelnde Rezeptoren (GPCR) über klar abgrenzbare Mechanismen, an denen unterschiedliche Signalproteine beteiligt sind. Im Falle der RTK für Epidermal Growth Factor (EGF), Colony-stimulating Factor (CSF)-1 und Insulin Growth Factor (IGF)-I konnte in den letzten Jahren eine wesentliche Beteiligung PTX-sensitiver G-Proteine an der jeweiligen Signalübertragung gezeigt werden.

Unsere Befunde zeigen erstmalig, daß PTX die durch PDGF induzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisierung an humanen Hautfibroblasten hemmt. Mechanistisch spielt dabei die direkte Interaktion von G-Proteinen mit dem PDGF-Rezeptor und der Phospholipase (PLC) γ eine Rolle. Wir konnten zeigen, daß nach Stimulation mit PDGF die Menge an $\text{G}\alpha_i$ -Protein zunimmt, die sich mit Antikörpern gegen den PDGF-Rezeptor koprizipitieren läßt. In gleicher Weise nimmt nach Stimulation mit PDGF die Menge an $\text{G}\alpha_i$ -Proteinen zu, die sich mit Antikörpern gegen PLC γ präzipitieren läßt. Diese Befunde stehen im Einklang mit vergleichbaren Ergebnissen, die für den EGF-Rezeptor gewonnen wurden. In diesem Szenario sind $\text{G}\alpha_i$ -Proteine an der durch EGF-Stimulation vermittelten Translokation an das Zytoskelett beteiligt. Ein vergleichbarer Mechanismus könnte auch im Falle des PDGF-Rezeptors vorliegen.

Interessanterweise konnte an NIH3T3-Fibroblasten im Gegensatz zu den geschilderten Ergebnissen an humanen Hautfibroblasten zwar eine Zunahme der $\text{G}\alpha_i$ -Protein-Assoziation mit dem PDGF-Rezeptor beobachtet werden, eine Vorbehandlung mit PTX bewirkte jedoch keine Hemmung der durch PDGF stimulierten Ca^{2+} -Signale. Diese Daten sind in guter Übereinstimmung mit einer Reihe von Untersuchungen zur Signaltransduktion von EGF und IGF-I. Hier wurde oft die Beobachtung gemacht, daß an primären Zellen eine Reihe früher Signale PTX-sensitiv sind, während dies an transformierten oder immortalisierten Zellen nicht mehr der Fall ist. Die Ursache hierfür wird u.a. in einer Hochregulation der Rezeptorzahl oder in Änderungen der Signaltransduktion in Folge des Transformationsprozesses vermutet. Man muß daher davon ausgehen, daß PTX-sensitive G-Proteine Signale, die durch Stimulation von RTK entstehen, verstärken und unterstützen können. Es spricht viel dafür,

daß dieser Effekt unter physiologischen Bedingungen von großer Relevanz für weitere zelluläre Antworten ist.

So haben wir an den primären Hautfibroblasten weiter untersucht, wie sich eine Behandlung mit PTX auf späte durch PDGF stimulierte Zellantworten auswirkt. Unsere Ergebnisse zeigen, daß die funktionelle Ausschaltung von G_i -Proteinen zu einer Hemmung der durch PDGF stimulierten DNA-Synthese und der Zellmotilität führt.

Frühere Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe hatten gezeigt, daß bei einer Gruppe von Patienten mit essentieller Hypertonie Ca^{2+} -Signale und DNA-Synthese nach Stimulation von Rezeptoren, die an PTX-sensitive G-Proteine koppeln, im Vergleich zu normotensiven Kontrollpersonen gesteigert sind. Interessanterweise waren auch die durch PDGF stimulierten Ca^{2+} -Signale und die DNA-Synthese an Zellen hypertensiver Patienten gesteigert. Eine Vorbehandlung der Zellen mit PTX führte zu einer Hemmung dieser Signale. In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß diese gesteigerten Ca^{2+} -Signale und die DNA-Synthese mit einem Polymorphismus im Gen der G-Protein-Untereinheit $G\beta 3$ (*GNB3* C825T) und dem Auftreten einer Spleißvariante, die als $G\beta 3s$ bezeichnet wurde, assoziiert sind.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob $G\beta 3s$ biologisch aktiv ist und mit dem PDGF-Rezeptor assoziieren kann. $G\beta 3s$ wurde dazu in verschiedenen Zelltypen exprimiert und es konnte gezeigt werden, daß $G\beta\gamma$ -Dimere mit $G\beta 3s$ PLC-Isoformen und die MAP-Kinase stimulieren können.

Nachdem die biologische Funktionalität von $G\beta 3s$ nachgewiesen werden konnte, wurde die Beteiligung von $G\beta 3$ bzw. $G\beta 3s$ an der Signaltransduktion von PDGF untersucht. Hierzu wurden Koimmunpräzipitationsversuche unter Verwendung von HA-markierten $G\beta$ -Proteinen durchgeführt, die eine direkte Interaktion von aktiviertem PDGF-Rezeptor und $G\beta$ -Proteinen - $G\beta 1$ und $G\beta 3$ - zeigen konnten. Zwar weisen die gesteigerten Ca^{2+} -Signale und die erhöhte DNA-Synthese nach PDGF-Stimulation in 825T-Allel-Trägern auch auf eine Interaktion des PDGF-Rezeptor mit $G\beta 3s$ hin, der endgültige Nachweis steht jedoch noch aus. Der hier beschriebenen Interaktion von G-Proteinen mit dem PDGF-Rezeptor könnte unter dem Gesichtspunkt der genetisch fixierten Unterschiede in der Signalübertragungsstärke nach Stimulation PTX-sensitiver G-Proteine und der Funktion von PDGF in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen, eine wichtige pathophysiologische Relevanz zukommen.

6. Literaturverzeichnis

- Arai, H.; Tsou, C.L.; Charo, I.F. (1997): Chemotaxis in a lymphocyte cell line transfected with C-C chemokine receptor 2B: evidence that directed migration is mediated by $\beta\gamma$ dimers released by activation of $G\alpha_i$ -coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 14495 – 14499.
- Bae, Y.S.; Kang, S.W.; Seo, M.S.; Baines, I.C.; Tekle, E.; Chock, P.B.; Rhee, S.G. (1997): Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 272: 217 – 221.
- Bae, Y.S.; Cantley, L.G.; Chen, C.S.; Kim, S.R.; Kwon, K.S.; Rhee, S.G. (1998): Activation of phospholipase C- γ by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 273: 4465 – 4469.
- Balk, S.D.; Whitfield, J.F.; Youdale, T.; Braun, A.C. (1973): Roles of calcium, serum, plasma and folic acid in the control of proliferation of normal and rous sarcoma virus infected chicken fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 675 – 679.
- Bergsten, E.; Uutela, M.; Li, X.; Pietras, K.; Östman, A.; Heldin, C.H.; Alitalo, K.; Eriksson, U. (2001): PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF β -receptor. *Nat. Cell Biol.* 3: 512 – 516.
- Berk, B.C.; Alexander, R.W.; Brock, T.A.; Gimbrone Jr., M.A.; Webb, R.C. (1986): Vasoconstriction: a new activity for Platelet-derived growth factor. *Science* 232: 87 – 90.
- Berridge, M.J. (1993): Inositol triphosphate and calcium signaling. *Nature* 361: 315 – 325.
- Biesen van, T.; Hawes, B.E.; Luttrell, D.K.; Krueger, G.M.; Touhara, K.; Porfiri, E.; Sakaue, M.; Luttrell, L.M.; Lefkowitz, R.J. (1995): Receptor-tyrosine-kinase- and $G\beta\gamma$ -mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature* 376: 781 – 784.
- Biesen van, T.; Luttrell, L.M.; Hawes, B.E.; Lefkowitz, R.J. (1996): Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocrine Rev.* 17: 698 – 714.
- Birnbaumer, L.; Birnbaumer, M. (1995): Signal transduction by G-proteins. *J. Recept. Signal Res.* 15: 213 – 252.
- Boström, H.; Willetts, K.; Pekny, M.; Levéen, P.; Lindahl, P.; Hedstrand, H.; Pekna, M.; Hellström, M.; Gebre-Medhin, S.; Schalling, M.; Nilsson, M.; Kurland, S.; Törnell, J.; Heath, J.K.; Betsholtz, C. (1996): PDGF-A signalling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. *Cell* 85: 863 – 873.
- Castoria, G.; Migliaccio, A.; Green, S.; Di Domenico, M.; Chambon, P.; Auricchio, F. (1993): Properties of a purified estradiol-dependent calf-uterus tyrosine kinase. *Biochemistry* 32: 1740 – 1750.
- Chattopadhyay, M.V.; Ji, Q.S.; Mernaugh, R.; Carpenter, G. (1999): The role of individual SH2 domains in mediating association of phospholipase C- γ 1 with activated EGF receptor. *J. Biol. Chem.* 274: 26091 – 26097.
- Chen, Y.; Weng, G.; Li, J.; Harry, A.; Pieroni, J.; Dingus, J.; Hildebrandt, J.; Guarinieri, F.; Weinstein, H.; Iyengar, R. (1997): A surface on the G protein β -subunit involved in interactions with adenylyl cyclases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2711 – 2714.
- Choudhury, G.G.; Biswas, P.; Grandaliano, G.; Fouqueray, B.; Harvey, S.A.; Abboud, H.E. (1994): PDGF-mediated activation of phosphatidylinositol 3 kinase in human mesangial cells. *Kidney Int.* 46: 37 – 47.
- Claesson-Welsh, L. (1994): Platelet-derived growth factor receptor signals. *J. Biol. Chem.* 269: 32023 – 32026.
- Clapham, D.E.; Neer, E.J. (1997): G protein $\beta\gamma$ subunits. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37: 167 – 203.

- Conway, A.M., Rakhit, S.; Pyne, S.; Pyne, N.J. (1999): Platelet-derived-growth-factor stimulation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase pathway in airway smooth muscle: role of pertussis-toxin-sensitive G-proteins, c-src tyrosine kinases and phosphoinositide 3-kinase. *Biochem. J.* 337: 171 – 177.
- Corre, I.; Hermouet, S. (1995): Regulation of colony-stimulating factor 1-induced proliferation by heterotrimeric G₁₂ proteins. *Blood* 86: 1776 – 1783.
- Crespo P.; Xu, N.; Simonds, W.F.; Gutkind, J.S. (1994): Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature* 369: 418 – 420.
- Daub, H.; Wallasch, C.; Lankenau, A.; Herrlich, A.; Ulrich, A. (1997): Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J.* 16: 7032 – 7044.
- Della Rocca, G.J., van Biesen, T.; Daaka, Y.; Luttrell, D.K.; Luttrell, L.M.; Lefkowitz, R.J. (1997): Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 272: 19125 – 19132.
- Dikic, I.; Tokiwa, G.; Lev, S.; Courtneidge, S.; Schlessinger, J. (1996): A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature* 383: 547 – 550.
- Dikic, I. (1998): Protein tyrosine kinase couple G_i and G_q receptors with MAP kinase activation. *B. I. F. FUTURA* 13: 5 – 7.
- Erickson, A.K.; Payne, D.M.; Martino, P.A.; Rossomando, A.J.; Shabanowitz, J.; Weber, M.J.; Hunt, D.F.; Sturgill, T.W. (1990): Identification by mass spectrometry of threonine 97 in bovine myelin basic protein as a specific phosphorylation site for mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 265: 19728 – 19735.
- Fantl, W.J.; Escobedo, J.A.; Martin, G.A.; Turck, C.W.; del Rosario, M.; McCormick, F.; Williams, L.T. (1992): Distinct phosphotyrosines on a growth factor receptor bind to specific molecules that mediate different signaling pathways. *Cell* 69: 413 – 423.
- Feinstein, D.L.; Larhammar, D. (1990): Identification of a conserved protein motif in a group of growth factor receptors. *FEBS Lett.* 282: 7 – 11.
- Finkel, T. (1998): Oxygen radicals and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: 248 – 253.
- Ford, C.E.; Nikolai, P.S.; Bae, H.; Daaka, Y.; Reuveny, E.; Shekter, L.R.; Rosal, R.; Wenig, G.; Yang, C.S.; Iyengar, R.; Miller, R.J.; Jan, L.Y.; Lefkowitz, R.J.; Hamm, H.E. (1998): Molecular basis for interactions of G protein $\beta\gamma$ subunits with effectors. *Science* 280: 1271 – 1274.
- Garcia-Higuera, I.; Gaitatzes, C.; Smith, T.F.; Neer, E.J. (1998): Folding a WD repeat propeller. *J. Biol. Chem.* 273: 9041 – 9049.
- Gautam, N.; Downes, G.B.; Yan, K.; Kisselev, O. (1998): The G-protein $\beta\gamma$ complex. *Cell. Signal.* Vol. 10: 447 – 455.
- Gierschik, P.; Jakobs, K.H. (1992): ADP-ribosylation of signal transducing guanine nucleotide binding proteins by cholera and pertussis toxin. In: Herken, H., Hucho, H. (eds.) *Handbook of Experimental Pharmacology. Selective Neurotoxicity*. Springer, Berlin; 807 – 839.
- Gudermann, T.; Schöneberg, T.; Schultz, G. (1997): Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 20: 399 – 427.
- Gupta, S.K.; Gallego, C.; Johnson, G.L.; Heasley, L.E. (1992): MAP kinase is constitutively activated in gip2 and Src transformed rat 1a fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 267: 7987 – 7990.
- Grynkiewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R.Y. (1985): A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440 – 3450.

- Hall, R.A.; Premont, R.T.; Lefkowitz, R.J. (1999): Heptahelical receptor signalling: beyond the G protein paradigm. *J. Cell Biol.* 145: 927 – 932.
- Hallak, H.; Seiler, A.M.; Green, J.S.; Ross, B.N.; Rubin, R. (2000): Association of heterotrimeric G_i with the insulin-like growth factor-I receptor. *J. Biol. Chem.* 275: 2255 – 2258.
- Hamerman, D.; Taylor, S.; Kirschenbaum, I.; Klagsbrun, M.; Raines, E.W.; Ross, R.; Thomas, K.A. (1987): Growth factors with heparin binding affinity in human synovial fluid. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 186: 384 – 389.
- Hamm, H. E. (1998): The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem.* 273: 669 – 672.
- Harlan, J.E.; Hajduk, P.J.; Yoon, H.S.; Fesik, S.W. (1994): Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* 371: 168 – 170.
- Hasegawa-Sasaki, H.; Lutz, F.; Sasaki, T. (1988): Pathway of phospholipase C activation initiated with platelet-derived growth factor is different from that initiated with vasopressin and bombesin. *J. Biol. Chem.* 263: 12970 – 12976.
- Hawes, B.E.; van Biesen, T.; Koch, W.J.; Luttrell, L.M.; Lefkowitz, R.J. (1995): Distinct pathways of Gi- and Gq-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* 270: 17148 – 17153.
- Hedin, K.E.; Bell, M.P.; Huntoon, C.J.; Karnitz, L.M.; McKean, D.J. (1999): G_i proteins use a novel $\beta\gamma$ - and Ras-independent pathway to activate extracellular signal-regulated kinase and mobilize AP-1 transcription factors in Jurkat T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 274: 19992 – 20001.
- Heldin, C.H.; Westermark, B.; Wasteson, A. (1979): Platelet-derived growth factor: purification and partial characterisation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3722 – 3726.
- Heldin, C.H. (1995): Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80: 213 – 223.
- Heldin, C.H.; Westermark, B. (1996): Role of platelet-derived growth factor in vivo. In: R.A.F. Clark (ed.), *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*, 2nd edn., Plenum Press, NY: 259 – 273.
- Heldin, C.H.; Östman, A.; Rönstrand, L. (1998): Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochem. Biophys. Acta* 1378: F79 – F113.
- Hepler, J.R.; Jeffs, R.A.; Huckle, W.R.; Outlaw, H.E.; Rhee, S.G.; Earp, H.S.; Harden, T.K. (1990): Evidence that the epidermal growth factor receptor and non-tyrosine kinase hormone receptors stimulate phosphoinositide hydrolysis by independent pathways. *Biochem. J.* 270: 337 – 344.
- Higashijima, T.; Uzu, S.; Nakajima, T.; Ross, E.M. (1988): Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). *J. Biol. Chem.* 263: 6491 – 6494.
- Higashijima, T.; Burnier, J.; Ross, E.M. (1990): Regulation of G_i and G_o by mastoparan, related amphiphilic peptides and hydrophobic amines. Mechanism and structural determinants of activity. *J. Biol. Chem.* 265: 14176 – 14186.
- Huang, C.L.; Ives, H.E. (1989): Guanosine 5'-O-(3-thiophosphate) potentiates both thrombin and platelet-derived growth factor-induced inositol phosphate release in vascular smooth muscle cells. Signaling mechanisms distinguished by sensitivity to pertussis toxin and phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 264: 4391 – 4397.
- Huang, L.; Shanker, Y.G.; Dubauskaite, J.; Zheng, J.Z.; Yan, W.; Rosenzweig, S.; Spielman, A.I.; Max, M.; Margolskee, R.F. (1999): G γ 13 colocalizes with gustducin in taste receptor cells and mediates IP₃ responses to bitter denatonium. *Nat. Neurosci.* 2: 1055 – 1062.
- Imamura, K.; Kufe, D. (1988): Colony-stimulating factor 1-induced Na⁺ influx into human monocytes involves activation of a pertussis toxin-sensitive GTP-binding protein. *J. Biol. Chem.* 263: 14093 – 14098.

- Inglese, J.; Luttrell, L.M.; Iniguez-Lluhi, J.A.; Touhara, K.; Koch, W.J.; Lefkowitz, R.J. (1994): Functionally active targeting domain of the β -adrenergic receptor kinase: an inhibitor of G $\beta\gamma$ -mediated stimulation of type II adenylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3637 – 3641.
- Iri, T.; Farfel, Z.; Bourne, H.R. (1998): G-protein diseases furnish a model for the turn-on switch. *Nature* 394: 35 – 38.
- Irvine, R. (1998): Inositol phospholipids: translocation, translocation, translocation. *Curr. Biol.* 8: R557 – R559.
- Ji, Q.S.; Chattopadhyay A.; Vecchi, M.; Carpenter, G. (1999): Physiological requirement for both SH2 domains for phospholipase C- γ 1 function and interaction with platelet-derived growth factor receptors. *Mol. Cell. Biol.* 19: 4961 – 4970.
- Jo, H.; Byer, S.; McDonald, J.M. (1993): Insulin stimulates association of a 41 kDa G-protein (G_{IR41}) with the insulin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196: 99 – 106.
- Johnson, R.M.; Connelly, P.A.; Sisk, R.B.; Pobiner, B.F.; Hewlett, E.L.; Garrison, J.C. (1986): Pertussis toxin or phorbol 12-myristate 13-acetate can distinguish between epidermal growth factor- and angiotensin-stimulated signals in hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2032 – 2036.
- Johnson, R.M.; Garrison, J.C. (1987): Epidermal growth factor and angiotensin II stimulate formation of inositol 1,4,5- and inositol 1,3,4-trisphosphate in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 262: 17285 – 17293.
- Kamat, A.; Carpenter, G. (1997): Phospholipase C- γ 1: regulation of enzyme function and role in growth factor-dependent signal transduction. *Cytokine & Growth Factor Review* 8: 109 – 117.
- Kazlauskas, A.; Cooper, J.A. (1989): Autophosphorylation of the PDGF receptor in the kinase insert region regulates interactions with cell proteins. *Cell* 58: 1121 – 1133.
- Keating, M.T.; Williams, L.T. (1988): Autocrine stimulation of intracellular PDGF receptors in v-sis-transformed cells. *Science* 239: 914 – 916.
- Kelley, G.G.; Reks, S.E.; Ondrako, J.M.; Smrcka, A.V. (2001): Phospholipase C ϵ : a novel Ras effector. *EMBO J.* 20: 743 – 754.
- Klinghoffer, R.A.; Kazlauskas, A. (1995): Identification of a putative Syp substrate, the PDGF β receptor. *J. Biol. Chem.* 270: 22208 – 22217.
- Koch, W.J.; Hawes, B.E.; Allen, L.F.; Lefkowitz, R.J. (1994): Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G $\beta\gamma$ activation of p21ras. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12706 – 12710.
- Kopf, G.S.; Woolkalis, M.J. (1991): ADP-Ribosylation of G proteins with pertussis toxin. *Methods Enzymol.* 195: 257 – 266.
- Krieger-Brauer, H.I.; Medda, P.K.; Kather, H. (1997): Insulin-induced activation of NADPH-dependent H₂O₂ generation in human adipocyte plasma membranes is mediated by G α_{i2} . *J. Biol. Chem.* 272: 10135 – 10143.
- Kumjian, D.A.; Wahl, M.I.; Rhee, S.G.; Daniel, T. O. (1989): Platelet-derived growth factor (PDGF) binding promotes physical association of PDGF receptor with phospholipase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8232 – 8236.
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680 – 685.
- LaRochelle, W.J.; Jeffers, M.; McDonald, W.F.; Chillakuru, R.A.; Giese, N.A.; Lokker, N.A.; Sullivan, C.; Boldog, F.L.; Yang, M.; Vernat, C.; Burgess, C.E.; Fernandes, E.; Deegler, L.L.; Rittman, B.; Shimkets, J.;

- Shimkets, R.A.; Rothberg, J.M.; Lichenstein, H.S. (2001): PDGF-D, a new protease-activated growth factor. *Nat. Cell Biol.* 3: 517 – 521.
- Lee, S.B.; Rhee, S.G. (1995): Significance of PIP₂ hydrolysis and regulation of phospholipase C isoenzymes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 183 – 189.
- Letterio, J.J.; Coughlin, S.R.; Williams, L.T. (1986): Pertussis-toxin sensitive pathway in the stimulation of c-myc expression and DNA synthesis by bombesin. *Science* 234: 1117 – 1119.
- Lev, S.; Moreno, H.; Martinez, R.; Canoll, P.; Peles, E.; Musaccio, J.M.; Plowman, G.D.; Rudy, B.; Schlessinger, J. (1995): Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca⁽²⁺⁾-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* 376: 737 – 745.
- Levéen, P.; Pekny, M.; Gebre-Medhin, S.; Swolin, B.; Larson, E.; Betsholtz, C. (1994): Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev.* 8: 1875 – 1887.
- Li, W.; Nishimura, R.; Kashishian, A.; Batzer, A.G.; Kim, W.J.H.; Cooper, J.A.; Schlessinger, J. (1994): A new function for a phosphotyrosine phosphatase: linking GRB2-Sos to a receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* 14: 509 – 517.
- Li, X.; Pontén, A.; Aase, K.; Karlsson, L.; Abramsson, A.; Uutela, M.; Bäckström, G.; Hellström, H.; Li, H.; Soriano, P.; Betsholtz, C.; Heldin, C.H.; Alitalo, K.; Östman, A.; Eriksson, U. (2000): PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF α -receptor. *Nat. Cell Biol.* 2: 302 – 309.
- Liang, M.; Garrison, J.C. (1991): The Epidermal Growth Factor Receptor is coupled to a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide regulatory protein in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 266: 13342 – 13349.
- Lin, L.L.; Wartmann, M.; Lin, A.Y.; Knopf, J.L.; Seth, A.; Davis, R.J. (1993): cPLA₂ is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 72: 269 – 278.
- Linseman, D.A.; Benjamin, C.W.; Jones, D.A. (1995): Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 270: 12563 – 12568.
- Lopez, I.; Mak, E.C.; Ding, J.; Hamm, H.E.; Lomasney, J.W. (2001): A novel bifunctional phospholipase C that is regulated by G α_{12} and stimulates the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 276: 2758 – 2765.
- Lopez-Illasca, M.; Crespo, P.; Pellici, P.G.; Gutkind, S.; Wetzker, R. (1997): Linkage of G-protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI3-kinase γ . *Science* 275: 394 – 397.
- Luttrell, L.; Kilgour, E.; Lerner, J.; Romero, G. (1990): A pertussis toxin-sensitive G-protein mediates some aspects of insulin action in BC3H-1 murine myocytes. *J. Biol. Chem.* 265: 16873 – 16879.
- Luttrell, L. M.; van Biesen, T.; Hawes, B.E.; Koch, W.J.; Touhara, K.; Lefkowitz, R.J. (1995): G $\beta\gamma$ subunits mediate mitogen-activated protein kinase activation by the tyrosine kinase insulin-like growth factor 1 receptor. *J. Biol. Chem.* 270: 16495 – 16498.
- Luttrell, L.M.; Hawes, B.E.; van Biesen, T.; Luttrell D.K.; Lansing, T.J.; Lefkowitz, R.J. (1996): Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor and G $\beta\gamma$ subunit mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 271: 19443 – 19450.
- Luttrell, L.M.; Della Rocca, G.J.; van Biesen, T.; Luttrell, D.K.; Lefkowitz, R.J. (1997): G $\beta\gamma$ subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 272: 4637 – 4644.
- Meloche, S.; Pagès, G.; Pouyssegur, J. (1992): Functional expression and growth factor activation of an epitope-tagged p44 mitogen-activated protein kinase, p44^{mapk}. *Mol. Biol. Cell* 3: 63 – 71.

- Mori, S.; Rönstrand, L.; Yokote, K.; Engström, Å.; Courtneidge, S.A.; Claesson-Welsh, L.; Heldin, C.H. (1993): Identification of two juxtamembrane autophosphorylation sites in the PDGF β -receptor; involvement in the interaction with Src family tyrosine kinases. *EMBO J.* 12: 2257 – 2264.
- Neer, E.J.; Schmidt, C.J.; Nambudripad, R.; Smith, T.F. (1994): The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* 371: 297 – 300.
- Neer, E.J. (1995): Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80: 249 – 257.
- Neer, E.J.; Smith, T.F. (1996): G protein heterotrimers: new structures propel new questions. *Cell* 84: 175 – 178.
- Neptune, E.R.; Bourne, H.R. (1997): Receptors induce chemotaxis by releasing $\beta\gamma$ subunit of G_i , not by activating G_q or G_s . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 14489 – 14494.
- Nishimoto, I.; Murayama, Y.; Toshiaki, K.; Ui, M.; Ogata, E. (1989): Possible direct linkage of insulin-like growth factor-II receptor with guanine nucleotide-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 264: 14029 – 14038.
- Okano, Y.; Takagi, H.; Tohmatsu, T.; Nakashima, S.; Kuroda, Y.; Saito, K.; Nozawa, Y. (1985): A wasp venom mastoparan-induced polyphosphoinositide breakdown in rat peritoneal mast cells. *FEBS Lett.* 188: 363 – 366.
- Olivera, A.; Spiegel, S. (1993): Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* 365: 557 – 560.
- Pawson, T.; Scott, J.D. (1997): Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278: 2075 – 2080.
- Peraldi, P.; Zhao, Z.; Filloux, C.; Fischer, E.H.; van Obberghen, E. (1994): Protein-tyrosine-phosphatase 2C is phosphorylated and inhibited by 44-kDa mitogen-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5002 – 5006.
- Piiper, A.; Stryjek-Kaminska, D.; Zeuzem, S. (1997): Epidermal growth factor activates phospholipase $C\gamma$ via G_{i1-2} proteins in isolated pancreatic acinar membranes. *Am. J. Physiol.* 272: G1276 – G1284.
- Pietruck, F.; Moritz, A.; Montemurro, M.; Sell, A.; Busch, S.; Roskopf, D.; Virchow, S.; Esche, H.; Brockmeyer, N.; Jakobs, K.H.; Siffert, W. (1996): Selectively enhanced cellular signalling by G_i proteins in essential hypertension. $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, $G\beta_1$, and $G\beta_2$ are not mutated. *Circ. Res.* 79: 974 – 983.
- Pietruck, F.; Busch, S.; Virchow, S.; Brockmeyer, N.; Siffert, W. (1997): Signalling properties of lysophosphatidic acid in primary human skin fibroblasts: role of pertussis toxin-sensitive GTP-binding proteins. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 355: 1 – 7.
- Pike, L.J.; Eakes, A.T. (1987): Epidermal growth factor stimulates the production of phosphatidylinositol monophosphate and the breakdown of polyphosphoinositides in A431 cells. *J. Biol. Chem.* 262: 1644 – 1651.
- Poch, E.; González, D.; Gómez-Angelats, E.; Enjuto, M.; Paré, J.C.; Rivera, F.; de la Sierra, A. (2000): G-protein β_3 subunit gene variant and left ventricular hypertrophy in essential hypertension. *Hypertension* 35: 214 – 218.
- Pröfrock, A.; Schnefel, S.; Schulz, I. (1991): Receptors for insulin interact with G_i -proteins and for epidermal growth factor with G_i - and G_s -proteins in rat pancreatic acinar cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175: 380 – 386.
- Proud, C.G. (1994): Translation. Turned on by insulin. *Nature* 371: 747 – 748.
- Rakhit, S.; Pyne, S.; Pyne, N.J. (2000): The platelet-derived growth factor receptor stimulation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase in airways smooth muscle involves a G-protein-mediated tyrosine phosphorylation of Gab1. *Mol. Pharmacol.* 58: 413 – 420.

- Raines, E.W.; Bowen-Pope, D.F.; Ross, R. (1990): Platelet-derived growth factor. In: M.B. Sporn, A.B. Roberts (eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology*. Peptide growth factors and their receptors, Springer, Heidelberg 95: 173 – 262.
- Rhee, S.G.; Bae, Y.S. (1997): Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* 272: 15045 – 15048.
- Robson, M.C.; Phillips, L.G.; Thomason, A.; Robson, L.E.; Pierce, G.F. (1992): Platelet-derived growth factor BB for the treatment of chronic pressure ulcers. *Lancet* 339: 23 – 25.
- Rodt, S.Å.; Åhlén, K.; Berg, A.; Rubin, K.; Reed, R.K. (1996): A novel physiological function for platelet-derived growth factor-BB in rat dermis. *J. Physiol. (Lond.)* 495: 193 – 200.
- Ross, R. (1986): The pathogenesis of atherosclerosis: an update. *N. Engl. J. Med.* 314: 488 – 500.
- Schündeln, Michael (2001): Beteiligung PTX-sensitiver G-Proteine an der Signaltransduktion von Platelet-derived Growth Factor (PDGF). Dissertation an der Medizinischen Fakultät, Gesamthochschule Essen.
- Sekiya, F.; Bae, Y.S.; Jhon, D.Y.; Hwang, S.C.; Rhee, S.G. (1999): AHNAK, a protein that binds and activates phospholipase C- γ 1 in the presence of arachidonic acid. *J. Biol. Chem.* 274: 13900 – 13907.
- Siffert, W.; Roskopf, D.; Siffert, G.; Busch, S.; Moritz, A.; Erbel, R.; Sharma, A.M.; Ritz, E.; Wichmann, H.E.; Jakobs, K.H.; Horsthemke, B. (1998): Association of human G-protein β 3 subunit variant with hypertension. *Nat. Genet.* 18: 45 – 48.
- Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76 – 85.
- Sondek, J.; Bohm, A.; Lambright, D.G.; Hamm, H.E.; Sigler, P.B. (1996): Crystal structure of a G_A protein $\beta\gamma$ dimer at 2.1 Å resolution. *Nature* 379: 369 – 374.
- Soriano, P. (1994): Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF β -receptor mutant mice. *Genes Dev.* 8: 1888 – 1896.
- Soriano, P. (1997): The PDGF α receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites. *Development* 124: 2691 – 2700.
- Spiegel, S.; Milstien, S. (2000): Sphingosine-1-phosphate: signaling inside and out. *FEBS Lett.* 476: 55 – 57.
- Taylor, C.W.; Blakeley, D.M.; Corps, A.N.; Berridge, M.J.; Brown, K.D. (1988): Effects of pertussis toxin on growth factor-stimulated inositol phosphate formation and DNA synthesis in Swiss 3T3 cells. *Biochem. J.* 249: 917 – 920.
- Tang, W.J.; Gilman, A.G. (1991): Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein $\beta\gamma$ subunits. *Science* 254: 1500 – 1503.
- Teitelbaum, I.; Strasheim, A.; Berl, T. (1990): Epidermal growth factor-stimulated phosphoinositide hydrolysis in cultured rat inner medullary collecting tubule cells. *J. Clin. Invest.* 85: 1044 – 1050.
- Touhara, K.; Inglese, J.; Pitcher, J.A.; Shaw, G.; Lefkowitz, R.J. (1994): Binding of G protein $\beta\gamma$ -subunits to pleckstrin homology domains. *J. Biol. Chem.* 269: 10217 – 10220.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 76: 4350 – 4354.
- Tsukada, S.; Simon, M.I.; Witte, O.N.; Katz, A. (1994): Binding of $\beta\gamma$ subunits of heterotrimeric G proteins to the PH domain of Bruton tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11256 – 11260.

- Waterfield, M.D.; Scrace, G.T.; Whittle, N.; Stroobant, P.; Johnsson, A.; Wasteson, A.; Westermark, B.; Heldin, C.H.; Hunag, J.S.; Deuel, T.F. (1983): Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p^{28_{sis}} of simian sarcoma virus. *Nature* 304: 35 – 39.
- Weingarten, R.; Ransnäs, L.; Mueller, H.; Sklar, L.A.; Bokoch, G.M. (1990): Mastoparan interacts with the carboxyl terminus of the α subunit of G_i. *J. Biol. Chem.* 265: 11044 – 11049.
- Whitman, S.C.; Daugherty, A.; Post, S.R. (2000): Macrophage colony-stimulating factor rapidly enhances β -migrating very low density lipoprotein metabolism in macrophages through activation of a G_{i/o} protein signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 275: 35807 – 35813.
- Yamauchi, J.; Kaziro, Y.; Ithoh, H. (1997): C-terminal mutation of G protein β subunit affects differentially extracellular signal-regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase pathways in human embryonal kidney 293 cells. *J. Biol. Chem.* 272: 7602 – 7607.
- Yan, K.; Gautam, N. (1997): Structural determinants for interaction with three different effectors on the G protein β subunit. *J. Biol. Chem.* 272: 2056 – 2059.
- Yang, L.J.; Baffy, G.; Rhee, S.G.; Manning, D.; Hansen, C.A.; Williamson, J.R. (1991): Pertussis toxin-sensitive G_i protein involvement in epidermal growth factor-induced activation of phospholipase C γ in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 266: 22451 – 22458.
- Yang, L.J.; Camoratto, A.M.; Baffy, G.; Raj, S.; Manning, D.R.; Williamson, J.R. (1993): Epidermal growth factor-mediated signalling of G_i-protein to activation of phospholipases in rat-cultured hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 268: 3739 – 3746.
- Yang, L.J.; Rhee, S.G.; Williamson, J.R. (1994): Epidermal growth factor-induced activation and translocation of phospholipase C- γ 1 to the cytoskeleton in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 269: 7156 – 7162.
- Yao, R.; Cooper, G.M. (1995): Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 267: 2003 – 2006.
- Zhang, L. M.; Newman, W. H.; Castresana, M. R.; Hildebrand, J. D. (1994): The effect of PTX on the growth of VSMCs stimulated by serum or PDGF. *Endocrinology* 134: 1297 – 1304.
- Zhao, R.; Zhao, Z.J. (1999): Tyrosine phosphatase SHP-2 dephosphorylates the platelet-derived growth factor receptor but enhances its downstream signalling. *Biochem. J.* 338: 35 – 39.